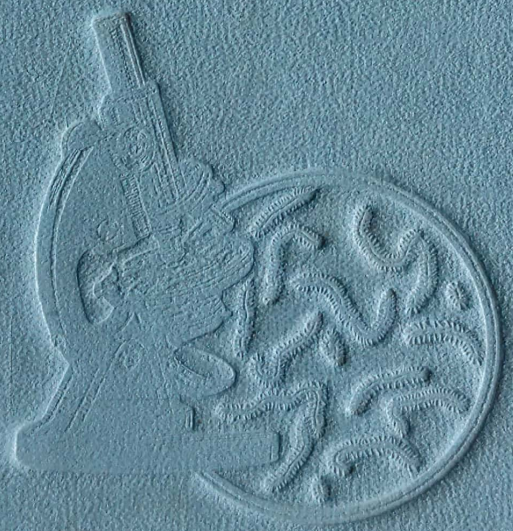
IAB II-1124
1124

N. STAMATIN

MICROBIOLOGIE VETERINARĂ

VOL. I.

2083



EDITURA AGRO-SILVICĂ DE STAT

2206

Scanned with OKEN Scanner

Laureat al Premiului de Stat
Profesor de microbiologie la Facultatea de medicină veterinară din Bucureşti
Directorul Secţiei de microbiologie a Institutului de patologie şi igienă animală

MICROBIOLOGIE VETERINARĂ

VOLUMUL I

MICROBIOLOGIE GENERALĂ

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Microbiologia a luat în timpurile noastre o dezvoltare a cărei amploare depășește cu mult pe a altor discipline ale biologiei. Necesitățile practice au impus, într-adevăr, crearea, în toate țările lumii, a numeroase institute de microbiologie, în care mii de cercetători urmăresc, cu dîrzenie, fie problemele legate de combaterea bolilor microbiene la om, animale și plante, fie probleme legate de îmbunătățirea producțiilor agricole sau industriale care depind, într-o măsură mai mică sau mai mare de activitatea unor microbi, fie probleme de biologie generală, care își pot găsi o mai lesnicioasă rezolvare în cadrul microbiologiei, cum sînt problemele de morfologie, variabilitate, genetică etc. In aceste condiții nu este de mirare că asistăm la o adevărată avalanșă de lucrări de microbiologie publicate în sute de reviste și în zeci de limbi, lucrări care modifică, de la o zi la alta, profilul cunoștințelor noastre. A scrie o microbiologie, a căuta să fixezi într-o carte o știință care se mișcă într-un asemenea ritm este, de la sine înțeles, o problemă foarte grea.

Necesitățile muncii zilnice cer, totuși, o carte care să răspundă la unele nevoi urgente ale învățămîntului microbiologic, muncii din laboratoarele de microbiologie și, pentru acest motiv, am scris această „Microbiologie veterinară", în care am căutat să cuprind și să expun, sub o formă succintă și accesibilă, toate problemele mai importante ale acestei vaste științe. Este de la sine înțeles că textul are multe lacune, că multe probleme nu au fost atinse, iar altele au fost de-abia enunțate. Pentru a remedia lipsurile inerente unei cărți de dimensiunile acesteia și a înlesni documentarea cercetătorilor, fiecare volum va fi însoțit de o scurtă bibliografie.

Materialul va fi cuprins în trei volume. Un prim volum va trata despre problemele de microbiologie generală. In el se descriu caracterele generale ale bacteriilor și virusurilor filtrabile și se dau noțiuni sumare privind infecția și imunitatea. Volumul al doilea va fi de bacteriologie specială, iar

Scanned with OKEN Scanner

al treilea de virusologie specială. În al treilea volum se vor descrie și unele grupe de viețuitoare, încă neclasate definitiv, cum sînt rickettsiile și borrelomicetele, precum și ciupercile patogene. Acest din urmă volum se încheie cu un capitol de tehnică microbiologică.

Sperăm că această carte va fi utilă, în sensul că va înlesni rezolvarea, în mai bune condiții, a unor probleme pe care le pune practica, în primul rînd laboratoarelor veterinare și apoi tehnicienilor veterinari, va contribui la îmbunătățirea învățămîntului microbiologiei în Institutele de învățămînt superior și, în general, va servi la progresul microbiologiei în țara noastră.

AUTORUL

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA I

NOȚIUNI INTRODUCTIVE

Scanned with OKEN Scanner

EVOLUȚIA CUNOȘTINȚELOR NOASTRE DESPRE MICROBI

Societatea sclavagistă nu a cunoscut microbii, dar unii scriitori antici ca Tukidide, Varro[1], Lucretius, le-au bănuit existența. Tukidide, de exemplu, numește cauza bolilor contagioase *„contagium animatum"*, ceea ce dovedește că el admitea originea biologică a infecțiilor. Varro și Columella (din primul secol al erei noastre) admit că unele boli pot fi produse de ființe invizibile pe care le numesc *„animalia minuta"*.

În feudalism, Heronimus Fracastorius (Girolamo Fracastorio), care a trăit la Verona între anii 1478 și 1553, formulează și mai precis natura vie a agenților bolilor contagioase. Om de o înaltă erudiție, el a studiat toate științele existente în acea vreme și, în special, astronomia și medicina. În domeniul medicinei, el a scris două cărți și anume: prima *„De morbus Gallicus"* în 1530, adică boala galilor sau sifilisul (el întrebuințează, cel dintîi, termenul de sifilis pentru a desemna această infecție), și a doua *„De contagionae et contagiosis morbis et curatione"*, care apare, în 1546, la Veneția. În lucrarea din urmă se ocupă de modul cum se transmit bolile contagioase, ajungînd la concluzia că ele se transmit prin contact direct între oameni, prin obiecte și aer și că ceea ce se transmite este o materie, o ființă vie pe care el o numește *„contagium vivum"*. Contagiozitatea sifilisului și a altor boli i-a sădit lui Fracastorius convingerea că agenții lor sînt ființe vii, au caracterele esențiale ale materiei vii. Acești agenți este drept că nu se văd cu ochii, ceea ce se datorește, desigur, dimensiunilor lor foarte reduse, dar acest fapt nu poate exclude existența lor.

Raționamentul lui Fracastorius era just dar el nu putea fi suficient de convingător, mai ales în acele timpuri stăpînite de multiple și diverse erezii. Convingerea nu putea veni decît din vederea și examinarea directă a acestor cauze vii. Or, acest lucru nu era posibil, ochii omenești singuri neputîndu-le vedea, iar aparate optice suficient de puternice

---

[1] „Si qua loca erunt palustria, crescunt animalia quaedam minuta, quae non possunt oculi consequi et pera aera intus in corpora per os ac nares perveniunt, atque efficiunt difficiles morbos"

M. Terentius Varro (116—27 î.e.n.) (Rerum rusticarum de agricultura)

Antony van Leeuwenhoeck (1632 — 1723)

nu existau în acel timp. Două sute de ani mai tîrziu însă, un negustor de lentile din Olanda şi anume *Antony van Leeuwenhoeck* (1632—1723) construieşte un aparat optic, adică ceea ce numim astăzi un microscop, cu ajutorul căruia el reuşeşte să vadă particule invizibile cu ochii liberi. El face, de altfel, primele observaţii privind vieţuitoarele invizibile, pe care le numeşte animalicule *(animalcula)*. Într-o picătură de apă, în propria sa salivă, el vede o lume minusculă, care se agită cu vioiciune şi la cărei vedere îi dau indescriptibile bucurii.

Aceste animalicule aveau forme variate şi anume: rotunde, alungite ca un bastonaş sau alungite în formă de spirală; el le-a desenat şi desenele au însoţit lucrarea care s-a dat publicităţii pe cînd era încă în viaţă (1695). Lucrările lui Leeuwenhoeck au avut un oarecare răsunet în cercul strîmt al lumii ştiinţifice de atunci, dar nu au fost imediat urmate de rezultate practice şi de cercetări mai ample. Lumea contemporană era satisfăcută de explicaţiile mistico-religioase privind originea vieţii şi nu era spiritual pregătită, pentru ca, debarasîndu-se de prejudecăţile vremii, să admită că ar putea exista forme vii pe care ochiul uman să nu le poată distinge.

Cercetătorii care au urmat imediat după Leeuwenhoeck, puţini la număr, de altfel, au făcut unele observaţii asupra formei diverşilor microbi pe care îi găseau în mediile naturale. Astfel, Müller, cercetător danez, se ocupă de ceea ce se numeau atunci infuzori şi creează, în anul 1773 şi 1786, două genuri de microorganisme — *Vibrio* şi *Monas* — care s-au păstrat pînă astăzi în sistematicile bacteriene. Mai tîrziu, Ehrenberg, în anul 1838, publică cartea sa „Infuzorii ca organisme complexe", în care autorul împarte microorganismele din clasa infuzorilor în 22 de familii din care 3 familii de bacterii, denumite de autor: *Bacterium, Spirillum* şi *Spirocheta*. Aceşti termeni s-au păstrat de asemenea în sistematicile bacteriene din zilele noastre.

Lucrarea lui Ehrenberg (1795—1876) încheie o perioadă în ştiinţa microbiologică şi anume perioada exclusiv morfologică. Paralel cu ea, în prima şi mai ales în a doua jumătate a secolului al XIX-lea, ia naş-

tere și se dezvoltă perioada fiziologică, în care se studiază funcțiunile lumii microbiene. Această perioadă și acest studiu s-au arătat, în raport cu faza morfologică, mult mai fecunde.

Apariția perioadei fiziologice în microbiologie e legată, printre altele, de dezvoltarea capitalismului și a marii industrii, ca o consecință a revoluției burgheze din 1789. Capitalismul, în dezvoltarea sa progresivă, a pus oamenilor, spre rezolvare, din ce în ce mai multe probleme tehnice și acest lucru este lesne de înțeles. Intr-adevăr, micul vinificator sau micul crescător de viermi de mătase sînt desigur dezamăgiți de pierderile pe care le au în gospodăria lor, dar ei pot suporta aceste pierderi, pot supraviețui lor. Marea industrie capitalistă însă nu se poate compara cu micul producător căci pierderile în vinificare sau creșterea viermilor de mătase, de exemplu, au consecințe mult mai grave, mortale pentru industria mare. De aceea, capitalismul, pentru a-și atinge scopul și anume realizarea profitului maxim, caută să cunoască condițiile în care pierderile pot fi înlăturate și, în acest scop, el face apel la știință. In aceste condiții, chimiștii au fost solicitați să se ocupe de diversele probleme industriale, printre care și aceea a vinificării zahărului din struguri. Studiul acestei probleme a dus la o controversă vie, cu privire la originea acestui proces. Dacă, pentru Liebig, Berzelius, Wöhler și alții, procesul era de natură chimică și era rezultatul dezagregării albuminelor și mișcărilor atomice consecutive, pentru Pasteur, procesul era de natură biologică, fermentarea alcoolică fiind, așa cum se exprimă el însuși, legată de viața drojdiei. In afara drojdiei, în afara prezenței acestui germen viu, glucoza din struguri nu se transformă în vin. El a demonstrat acest fapt, de o importanță practică și teoretică incalculabilă, în diferite moduri. Astfel, el a amestecat zahăr, săruri amoniacale și drojdie, obținînd alcool, deși în amestec nu se găsea albumină. Pe de altă parte, el a constatat să zeama de struguri, recoltată aseptic din boabe, nu fermentează, adică zahărul conținut în această zeamă nu se transformă în alcool. In muzeul „Pasteur" din Arbois se găsesc și astăzi fiole în care el a pus zeamă de struguri, recoltată cu o pipetă sterilă din boabe a căror suprafață a fost în prealabil, dezinfectată. Această zeamă este și acum limpede. Aceste diverse constatări înlătură definitiv ipoteza chimică a lui Liebig. In același timp, ele l-au dus pe Pasteur la o altă problemă, cu consecințe practice și teoretice tot așa de mari și anume la problema originii acestor viețuitoare care fermentează glucoza. Unde se găsesc aceste microorganisme și cum ajung ele în zeama de struguri ? Se nasc oare spontan, din această zeamă, sau vin din afară ? Aceasta era întrebarea.

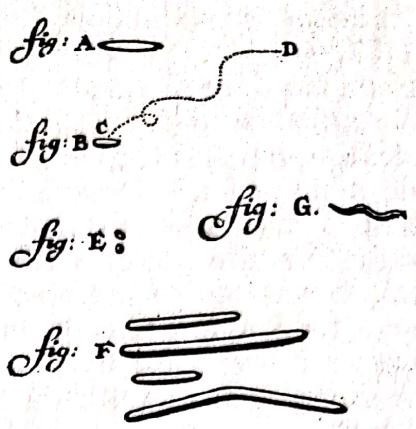


Fig. 1 — Primele imagini de bacterii prezentate de Leeuwenhoeck în Arcana Naturae (1695)

Nașterea spontană a diverselor viețuitoare, din materia inertă (abiogeneza), era o credință veche, care a dominat antichitatea și evul mediu și care stăpînea încă mintea unor oameni de știință contemporani cu Pasteur. Dacă se admitea, de către Aristotel (384—322 î.e.n.), că oile iau naștere din iarbă verde, de Pliniu cel Bătrîn (mort în anul

79 î.e.n.), că animalele de apă se nasc din mîl, iar de Van Helmont (1577—1644), că şobolanii iau naştere din boabe de grîu amestecate cu cîrpe murdare şi umede şi că, în general, condiţiile favorabile pentru o specie animală năşteau specia respectivă (această concepţie se reflectă şi în zicala romînească, „lac să fie, că broaşte se găsesc"), cu atît mai uşor era de admis că aceste vieţuitoare minuscule, care poartă numele de microbi, se pot naşte spontan. Această credinţă nu a fost contrazisă de nimeni timp de mai multe secole. Thomas Braun scrie în secolul al XVII-lea: „A te îndoi de germinarea viermilor în brînză, a gîndacilor în bălegar etc., înseamnă a te îndoi de judecata, simţul şi experienţa omenească. Acela care are asemenea îndoieli să se îndrepte spre Egipt şi acolo va găsi şoareci care s-au născut din mîlul Nilului, spre marea disperare a locuitorilor" [1].

Aceste date ne arată cît de împămîntenită era ideea naşterii spontane a vieţuitoarelor. Falsitatea acestei idei, bănuită de unii, nu fusese însă de nimeni, în mod peremptoriu, dovedită pînă la Pasteur. E drept că Spallanzani (1729—1799) în Italia şi Terehovski (1740—1796) în Rusia au arătat că infuzorii se nasc din părinţi asemănători, „infuzorii — spuneau ei — au părinţi", dar lucrările lor, nefiind bine conduse, nu au dat totdeauna rezultate nete. Intr-adevăr, lichidele nutritive folosite de ei nu se puteau totdeauna steriliza, în mod complet, printr-o simplă fierbere la 100°C, ceea ce arunca îndoială în mintea lor ca şi a acelora din jurul lor. In plus, ei nu cunoşteau prezenţa în aer a microbilor şi deci posibilitatea ca aceştia să pătrundă în mediu, o dată cu acest gaz, şi să le infecteze.

Experienţele întreprinse în această privinţă de Pasteur au fost mai bine conduse, au fost mult mai convingătoare şi au făcut ca acest savant să fie socotit ca omul care a spulberat, din mintea oamenilor, teoria generaţiei spontanee, aşa cum era înţeleasă pînă la el. Pasteur a arătat că soluţiile, filtrate sau încălzite, rămîn sterile, dacă sînt ferite de contactul cu aerul.

In zilele noastre, teoria generaţiei spontanee este reluată, în special de savanţii sovietici, şi cercetată, pe de o parte, în lumina materialismului dialectic şi, pe de altă parte, pe baza numeroaselor date ştiinţifice care s-au acumulat de la Pasteur pînă astăzi.

Teoria naşterii spontane a vieţii este acceptată astăzi de unii savanţi sovietici ca un fenomen posibil, care, în condiţii experimentale anumite s-ar putea reproduce în laborator, însă nu ca un proces care se petrece, în mod curent, în natură, în faza actuală de evoluţie a planetei noastre. De altfel, nici Engels şi nici actualii biologi nu socotesc naşterea vieţii ca un proces actual.

„Dar de cînd cunoaştem monerele fără structură ar fi absurd — scrie Engels, în această privinţă — să explicăm apariţia, fie chiar şi a unei singure celule, direct din materia moartă şi nu din albumina vie lipsită de structură, şi să ne închipuim că natura poate fi forţată cu ajutorul unei ape alterate să facă în 24 ore ceea ce a necesitat milioane de ani. Experienţele lui Pasteur, din acest punct de vedere, sînt inutile: celor care cred în posibilitatea generaţiei spontanee, el nu va reuşi niciodată să le demonstreze, numai prin experienţele sale, că ea nu este posibilă. Dar ele sînt importante fiindcă

[1] Thomas Braun citat de Fedorov în „Microbiologhia", Moscova, 1949, pag 16.

aruncă multă lumină asupra acestor organisme, asupra vieții lor, asupra germenilor lor etc." [1].

Cercetătorul Hudeakov a adus, în sprijinul inactualității creării vieții pe pămînt, un argument care pare a fi hotărîtor. El afirmă [2] că o condiție esențială a apariției vieții, condiție care s-a întîlnit o singură dată în istoria planetei noastre, fără să se mai repete vreodată, este lipsa oricărui organism viu. Pentru a evalua toată însemnătatea acestei condiții, este suficient să ne închipuim că undeva, în prezent, ar începe să se organizeze, din materia organică moartă, un nou organism. Ar putea oare aceasta să meargă pînă la capăt, fără obstacole? Desigur că nu. Înainte ca substanța organică să poată să se transforme într-un organism viu, ea ar fi distrusă de organismele deja existente. Nu trebuie să uităm, spune el, că organismele actuale, chiar cele mai simple, sînt totuși foarte perfecte și din această cauză se apără, cu succes, față de tendințele de distrugere a altor viețuitoare. Apariția unui nou organism este, chiar numai din această cauză, imposibilă în natură, în momentul de față. Simplă, nu numai din punct de vedere morfologic, dar și fiziologic, noua ființă n-ar putea rezista la întrecerea cu celelalte viețuitoare, și ora creării ei ar fi și ora morții ei.

Oparin (1952) apără același punct de vedere. El scrie că viața a luat naștere într-o anumită fază de dezvoltare a planetei noastre și că ea nu se mai poate naște în condițiile actuale. El definește viața astfel: „Viața este o formă particulară a mișcării materiei. Ea a luat naștere într-o anumită etapă a dezvoltării istorice și e reprezentată, în prezent, pe planeta noastră, printr-un număr enorm de sisteme individuale diferite de organisme" [3].

Experiențele lui Pasteur, privind falsitatea teoriei generației spontanee, astfel cum era înțeleasă de contemporanii săi, își păstrează, așa cum se exprimă și Engels, întreaga lor valoare practică și pe ele se sprijină întreaga tehnică bacteriologică. Pasteur a arătat că într-un lichid, oricît ar fi el de favorabil multiplicării unor microbi, aceștia nu se pot naște spontan. În mod practic, un asemenea lichid, încălzit în prealabil la 120°C și ferit apoi de orice contact cu mediul ambiant, rămîne lipsit de orice viețuitoare, oricît l-am conserva.

Studiul diverselor fermentații și constatarea că fiecare fel de fermentație este produsă de un anumit germen sădește în mintea lui Pasteur convingerea că infecțiile nu sînt decît un aspect particular al procesului de fermentație, sînt fermentații care se produc „in vivo". Agenții infecțiilor că și cei ai fermentațiilor sînt exogeni și înlăturînd accesul lor în organism se poate evita însăși infecția. Această concluzie a fost aplicată în chirurgie și ginecologie de Lister, în primul rînd, constatîndu-se că prin folosirea unor mijloace — antisepticele — care distrug microbii din plăgi și din camerele de operație și de naștere se reduceau, într-o proporție însemnată, pierderile datorite infecțiilor. Aceste rezultate îi dovedesc lui Pasteur că teoria microbiană a infecțiilor era justă. Pe această bază teoretică s-au sprijinit cercetătorii care, în timpul lui Pasteur și după el, au căutat și au identificat etiologia diverselor infecții ale plantelor, animalelor și oamenilor.

O dată aceste lucruri lămurite, Pasteur trece la studiul infecțiilor. Pornind pe acest drum și cercetînd proprietățile microorganismelor, izolate

[1] Engels Fr., Dialectica naturii, Editura de stat pentru literatură politică, București, pag. 305.

[2] Hudeakov N. N., Microbiologie agricolă, 1926, pag. 10 (citat de Fedorov în „Microbiologhia", Moscova, 1949, pag. 23).

[3] Oparin I. A., Viața, Jurnal obscei biologhii, 1951, nr. 6, pag. 369.

Scanned with OKEN Scanner

Louis Pasteur (1822 — 1895)

în stare pură, Pasteur face o serie de descoperiri, dintre care două şi anume: vaccinul anticărbunos şi vaccinul antirabic au făcut să fie considerat, pe lîngă părinte al microbiologiei, binefăcător al omenirii.

Eminentul biolog rus Timireazev scrie într-un articol publicat cu ocazia morţii lui Pasteur: „Marele savant, a cărui moarte o plîngem astăzi, a influenţat activitatea practicianului într-o măsură care nu poate fi comparată cu a nici unui alt om, în toată istoria civilizaţiei. Acţiunile lui au revoluţionat trei din cele mai vechi arte ale omului. În tehnologie, el a pus o temelie raţională şi solidă în toate ramurile ce au la bază fermentarea. În agricultură, ideile lui au căpătat o dezvoltare amplă prin lucrările lui Schlessing şi Vinogradski. În medicină, el a făcut un pas hotărîtor; după ce omul a încetat să se teamă de sălbăticiunile pădurilor, n-a fost pas mai hotărîtor ca cel făcut de Pasteur, care l-a învăţat pe om să se lupte cu microbii, fiinţe şi mai periculoase încă“ [1].

Louis Pasteur s-a născut, în anul 1822, la Dôle, în Franţa. El face studii liceale şi universitare şi, în 1847 devine doctor în ştiinţe, iar în 1852 este numit profesor de chimie la la Facultatea din Strassbourg. Nu rămîne mult timp aici, căci în 1857 este chemat director de studii la Şcoala normală din Paris. Aici, Pasteur face primele sale cercetări asupra fermentaţiilor şi, studiind aceste procese, îşi dă seama de natura lor biologică. Studiul bolilor infecţioase şi agenţilor lor îl începe în 1877. El se ocupă întîi de holera aviară, apoi de cărbunele bacteridian şi, în fine, de turbare. Transformarea virusului rabic de stradă într-un virus cu proprietăţi vaccinante atrage atenţia întregii lumi asupra persoanei sale. Din toată lumea vin oameni muşcaţi de ciini sau de lupi turbaţi pentru a fi trataţi. Prin subscripţie internaţională, se clădeşte, la Paris, un institut de cercetări microbiologice, care îi poartă numele.

Pasteur moare în 1895.

Un alt om de ştiinţă care trebuie considerat ca unul dintre fondatorii microbiologiei ştiinţifice este Robert Koch (1843—1910). El s-a dis-

[1] Timireazev K. A., citat de Fedorov în „Microbiologhia“, Moscova, 1949, pag. 30.

tins prin importante descoperiri. A arătat (1876), de exemplu, că bacilii cărbunelui se pot transforma în spori şi sub această formă ei persistă foarte mult timp în pământ. Koch a arătat importanţa pe care o are, în studiile bacteriologice, izolarea germenilor în stare pură şi a stabilit condiţiile în care un germen poate fi socotit drept cauză a unei infecţii. Tot el introduce, în bacteriologie (1881), mediile solide, întîi gelatina, iar apoi agarul. A făcut numeroase cercetări asupra dezinfecţiei, holerei asiatice etc. Lucrarea care l-a consacrat definitiv printre fondatorii microbiologiei o constituie descoperirea bacilului tuberculozei şi lucrările sale asupra acestui bacil şi a bolii pe care o produce.

Robert Koch (1843 — 1910)

MICROBIOLOGIA IN RUSIA ŞI U.R.S.S.

In Rusia, studiul microbilor a atras pe numeroşi cercetători care au făcut importante descoperiri în domeniul microbiologiei, contribuind în acest fel, la progresul ei. Astfel, Brauell, în 1849, descoperă bacilul cărbunelui în sîngele animalelor moarte de cărbune; Manasein şi Polotebnev (1872) pun primii în evidenţă antagonismul dintre ciuperci şi bacterii, observaţie care stă la baza terapiei prin antibiotice; Ţenkovski (1883) atenuează tulpinile virulente de bacili ai cărbunelui, după metoda pasteuriană, şi prepară un vaccin anticărbunos stabil, ceea ce a rezolvat problema aplicării practice a acestui produs; Konev determină condiţiile de atenuare a tulpinilor de bacili ai rujetului prin treceri pe iepuri şi prepară, astfel, un vaccin contra infecţiei produse de acest germen etc.

Printre cercetătorii ruşi care au contribuit într-o mare măsură la dezvoltarea microbiologiei, doi ocupă locuri de primul ordin şi anume: Ilia Mecinikov, descoperitorul fagocitozei şi fondatorul unei noi ştiinţe, imunologia, şi Dimitrie Ivanovski, descoperitorul virusurilor filtrabile şi fondatorul ştiinţei despre virusuri.

Fondatorul imunologiei, Ilia Mecinikov, s-a născut la Harkov, în anul 1845. Studiază întîi la Facultatea de ştiinţe din Harkov şi apoi în Germania. Funcţionează, din 1870, ca profesor de zoologie la Facultatea

Scanned with OKEN Scanner

Ilia Mecinikov (1845 — 1916)

din Odesa. In 1882, părăseşte acest post şi se dedică cercetărilor biologice. În cursul acestor cercetări, el observă că elementele figurate din organism — celulele albe din sînge şi unele celule din diverse ţesuturi — au funcţiuni importante în apărarea organismului faţă de acţiunea invazivă a microbilor. Prin această epocală descoperire, el devine fondatorul teoriei celulare a imunităţii, pe care a expus-o în monografia „Imunitatea în boalele infecţioase", publicată în 1901.

Mecinikov a atacat şi alte probleme de biologie legate de microbi. El a afirmat, de exemplu, că longevitatea umană este influenţată de flora microbiană intestinală. Anumiţi germeni, cum sînt *Bacillus bulgaricus* şi alţii care se găsesc, mai ales, în lapte, ar exercita funcţiuni antagoniste faţă de flora obişnuită (colibacili, anaerobi) şi nocivă a intestinelor. Eliminarea germenilor din urmă, prin acţiunea florei bacteriene din produsele lactate, ar constitui un factor important de prelungire a vieţii. Prin aceste descoperiri Mecinikov se situează printre fondatorii ştiinţei antibioticelor.

Fondatorul virusologiei, Dimitrie Ivanovski, s-a născut la 28 octombrie 1864, în satul Niz, de lîngă Petersburg (actualul Leningrad). În timpul studiilor liceale s-a remarcat printr-o deosebită sîrguinţă şi putere de înţelegere. Absolvind liceul, cu un deosebit succes, urmează secţia de ştiinţe naturale a Facultăţii de ştiinţe din Petersburg, unde cursurile erau predate de eminenţi oameni de ştiinţă ca Mendeleev, Beketov, Gobi şi alţii. Aceştia i-au inspirat dragostea faţă de ştiinţă şi l-au iniţiat în tehnica lucrărilor ştiinţifice. În timpul studiilor sale, în Rusia ca şi în alte ţări, se născuse un curent antidarwinist. Ivanovski îşi dă seama de falsitatea acestui curent şi se alătură darwiniştilor, susţinînd principiile esenţiale emise de celebrul naturalist.

La absolvirea studiilor el rămîne un timp în laboratorul de botanică al facultăţii, în care calitate a fost însărcinat să studieze, împreună cu Polovţev, o boală care producea pagube însemnate plantaţiilor de tutun din sudul Rusiei. În cursul acestor lucrări el arată că agentul bolii studiate este filtrabil şi necultivabil pe medii inerte, este deci ceea ce numim

Scanned with OKEN Scanner

astăzi un virus. In 1903, este numit șeful Departamentului de botanică de la Universitatea din Varșovia și, în 1907, profesor de fiziologie vegetală la aceeași universitate, iar în anul 1915 se refugiază, din cauza războiului, împreună cu laboratorul pe care-l conduce, la Rotsov. El moare aici, în anul 1919, necunoscut și modest, așa cum a fost întreaga sa viață.

Dimitrie Ivanovski (1864 — 1919)

Instaurarea regimului sovietic a dus la o înflorire și dezvoltare și mai mare a științelor microbiologice. Cercetările legate de microbiologia solului, microbiologia industrială și medicală au luat o amploare neîntîlnită în nici o altă țară din lume. Învățămîntul microbiologiei s-a extins în numeroase facultăți și i se acordă un loc de frunte. Eminenți oameni s-au dedicat acestei științe, făcînd descoperiri, cu largi aplicații practice. Printre aceștia, un loc de frunte îl ocupă Vinogradski (1856—1953), întemeietorul unei noi ramuri a microbiologiei și anume microbiologia solului. El a imaginat metode care permit izolarea, din mediile naturale, a unor specii bacteriene, utile agriculturii. Tot Vinogradski a arătat rolul pe care-l au bacteriile în introducerea carbonului și azotului în circuitul materiei organice în natură.

Tot cu privire la microbiologia solului, este necesar să amintim numele lui Omeleanski, care a precizat rolul bacteriilor în dezagregarea celulozei din sol și a descris asemenea specii bacteriene; numele lui Kosticev și Fedorova care au pus bazele teoriei chimismului fixării azotului atmosferic de către bacterii; numele lui Viliams, care a dovedit că humusul are origine biologică; numele lui Krasilnikov, care a adus contribuții importante la studiul actinomicetelor din sol și a publicat, în 1949, un determinator al bacteriilor și actinomicetelor de o necontestată valoare.

In domeniul microbiologiei medicale, trebuie să citățm, printre alții, pe Gamaleia (1859—1949), care a cercetat numeroase probleme privind bacteriile patogene pentru animale și om și combaterea infecțiilor pe care le produc. El a întemeiat, la Odesa, în 1886, primul Institut antirabic din Rusia. A preparat primele seruri antitoxice în Rusia, a organizat și con-

C 159768 Inv. 2003/85633

Scanned with OKEN Scanner

dus pînă la moarte, Institutul de microbiologie şi epidemiologie din Moscova: A studiat antraxul, holera asiatică, ciuma, morva, pesta bovină etc. În 1890 el scrie o monografie celebră despre holera asiatică. Tot Gamaleia a conceput o teorie originală cu privire la mecanismul imunităţii. A dezvoltat, în cursul lungii sale vieţi, o activitate publicistică considerabilă.

Trebuie să mai amintim aici pe Silber, Rîşkov, Jdanov, eminenţi cercetători în domeniul virusurilor filtrabile. Rîşkov, de exemplu, a pus la punct metode simplificate, pentru a obţine virusurile sub formă cristalizată, şi este autorul unei sistematici a virusurilor filtrabile.

DEZVOLTAREA MICROBIOLOGIEI ÎN ŢARA NOASTRĂ

În ţara noastră, microbiologia, în special cea medicală şi veterinară, s-a dezvoltat în condiţii mai bune ca alte ramuri ale ştiinţelor pozitive, şi acest lucru se datoreşte, pe de o parte, necesităţii rezolvării problemelor de ordin practic, legate de protecţia sănătăţii oamenilor şi animalelor, iar pe de altă parte oamenilor eminenţi care au servit-o şi şcolilor pe care ei le-au creat.

Fondatorul ştiinţei microbiologice romîneşti este Victor Babeş. Continuatorii lui Babeş şi făuritorii şcolilor de microbiologie umană şi veterinară au fost, respectiv, Ion Cantacuzino şi Paul Riegler.

Victor Babeş, fiul unui patriot romîn, s-a născut la Viena în anul 1854 şi a murit la Bucureşti în anul 1926. Studiile medicale şi le-a făcut la Budapesta şi Viena. Ucenicia ştiinţifică şi-a făcut-o pe lîngă anatomistul Langer. Funcţionează, după terminarea studiilor, întîi ca asistent şi apoi ca docent de anatomie patologică la Facultatea de medicină din Budapesta.

În 1886, Victor Babeş vine în ţară, unde a organizat şi condus un institut de bacteriologie şi patologie şi a funcţionat ca profesor la Facultatea de medicină. În aceste diverse calităţi, el a desfăşurat o activitate ştiinţifică prodigioasă, abordînd cele mai variate probleme de bacteriologie şi anatomie patologică, umană şi veterinară. El a publicat peste 1 000 de lucrări ştiinţifice. Împreună cu Cornil, în anul 1885, publică, pe cînd era încă docent al Facultăţii din Budapesta, un tratat, în limba franceză, intitulat: „Bacteriile şi rolul lor în anatomia şi histologia patologică", prima carte de acest fel şi care oglindeşte faza ştiinţei microbiologice din acel timp, cînd agenţii etiologici ai unei întregi serii de infecţii erau încă necunoscuţi. O nouă ediţie a acestui tratat, mult amplificată şi îmbunătăţită, apare în anul 1891.

Victor Babeş se ocupă de problema turbării, prepară vaccinul antirabic şi introduce vaccinarea antirabică în ţară. El arată, în anul 1888, că serul animalelor injectate, în repetate rînduri, cu ţesut rabic virulent, are proprietăţi preventive. Această descoperire îl situează, alături de Richet şi Hérricourt (1886), Mecinikov (1887), Behring (1890) printre fondatorii seroprevenţiei şi seroterapiei.

El prepară, în institutul pe care l-a creat, actualul Institut „Victor Babeş", primele seruri terapeutice — serul antidifteric etc. — şi abordează problema morvei la om şi animale.

Scanned with OKEN Scanner

Victor Babeș descoperă, împreună cu medicul veterinar Starcovici (1888), agenții așa-numitelor babesioze animale, agenți cunoscuți în întreaga lume ca babesii, după numele descoperitorului lor.

Se ocupă cu problema de antagonism bacterian, fiind, și în această privință, socotit ca un precursor mondial recunoscut.

Face cercetări privind morfologia bacteriană și descrie incluziile care-i poartă numele — incluzii Babeș-Ernst. Găsește, înaintea lui Negri, leziuni tipice — incluzii — în neuronii sistemului nervos al persoanelor și animalelor turbate.

Victor Babeș (1854 — 1926)

Victor Babeș se situează, prin numeroasele, variatele și importantele sale lucrări, nu numai printre fondatorii microbiologiei românești, dar printre fondatorii microbiologiei mondiale. Faima lui a depășit cu mult granițele țării sale. El este citat în toate tratatele clasice de microbiologie, botanică, biologie generală etc. In același timp, Victor Babeș a fost și un înfocat luptător pentru dreptatea socială, luînd o atitudine dîrză față de clasele exploatatoare care țineau poporul muncitor în mizerie și întuneric. In nenumărate rînduri s-a ridicat cu vehemență împotriva afacerismului politic, venalității și nepotismului, împotriva celor care întreținеau analfabetismul și bolile printre masele muncitoare. Omul de știință Babeș a fost dublat de un mare patriot, de un vajnic apărător al celor ce muncesc.

Ion Cantacuzino s-a născut la București, la 13 noiembrie 1863, și a murit tot în acest oraș la 14 ianuarie 1934. Studiile și le-a făcut în țară și apoi la Paris. Își ia întîi licența în filozofie, apoi în științele naturale și, în 1894, devine doctor în medicină. In 1892, fiind încă student, lucrează în laboratorul lui Mecinikov. Intre anii 1896 și 1901, funcționează ca asistent al lui Mecinikov, iar în 1901 este numit profesor de medicină experimentală la Facultatea de medicină din București, catedră pe care o ilustrează pînă la moarte.

A dezvoltat, în timpul vieții sale, o activitate științifică și organizatorică din cele mai de seamă. Activitatea științifică este oglindită în numeroasele note și memorii pe care le-a publicat și care se referă la variate probleme

Ion Cantacuzino (1863 — 1934)

de microbiologie şi imunitate. El a dovedit, printre altele, natura streptococică a scarlatinei şi a cercetat mecanismul imunităţii la nevertebrate.

Cantacuzino a organizat combaterea infecţiilor umane, a preparării mijloacelor biologice de combatere şi primul în ţara noastră, a iniţiat cercetări de epidemiologie. A condus lupta împotriva holerei şi tifosului exantematic, în perioada 1913—1920, a introdus, în ţara noastră, vaccinarea antituberculoasă, 1929—1934, a înfiinţat, singur sau în colaborare, diverse publicaţii ştiinţifice sau literare (Arhivele de biologie, în 1909, în colaborare cu Prof. I. Atanasiu, Revista ştiinţelor medicale, 1906, Arhivele romîne de patologie experimentală şi microbiologie, în 1926), precum şi diverse societăţi ştiinţifice.

Opera sa organizatorică cea mai de seamă o constituie însă Institutul de seruri şi vaccinuri (1922) care îi poartă numele şi unde s-a creat şi se dezvoltă cea mai însemnată şcoală de microbiologie romînească.

Paul Riegler s-a născut, în 1867, la Roman şi a murit în 1936 la Bucureşti. El a creat o şcoală de microbiologie veterinară în ţara noastră şi a preparat şi introdus, în practica medicinei veterinare, mijloacele biologice — vaccinuri şi seruri imune — de combatere a bolilor infecţioase la animale.

Paul Riegler, după terminarea studiilor secundare, intră în Şcoala superioară de medicină veterinară, obţinînd diploma de medic veterinar (1893) pe baza unei lucrări documentate privind infecţia morvoasă la animale. Scurt timp după terminare (1895) este numit şef de lucrări şi apoi şef de secţie în institutul lui Victor Babeş, unde funcţionează pînă în 1910. In preajma marelui maestru, el asimilează numeroase cunoştinţe de microbiologie şi anatomie patologică şi, în 1900, ocupă funcţia de profesor de microbiologie şi anatomie patologică la Şcoala superioară de medicină veterinară, funcţie pe care o deţine pînă la moarte.

Intîi pe lîngă Catedra de microbiologie şi apoi în Institutul „Pasteur", pe care-l înfiinţează şi îl conduce din 1909 şi pînă la moarte, el a iniţiat

prepararea tuturor serurilor și vaccinurilor, cu aplicație în medicina veterinară.

El a publicat, singur sau în colaborare cu Victor Babeș, I. Cantacuzino și alții, o serie de note și memorii, de o valoare științifică incontestabilă.

Riegler a demonstrat, astfel, împreună cu A. Ciucă, receptivitatea bovideelor față de infecția morvoasă experimentală, a studiat toxicitatea bacilului morvei, a cercetat patogenitatea unei bacterii din grupul *Proteus* pentru pești etc.

În jurul profesorului Riegler, la catedră și la institut, s-au format o serie de elemente care au contribuit la dezvoltarea microbiologiei românești și la rezolvarea problemelor practice legate de combaterea bolilor infecțioase la animale. Școala de microbiologie pe care a creat-o constituie, desigur, cel mai mare merit al profesorului Riegler.

Paul Riegler (1867 — 1936)

Activitatea sa didactică, științifică și organizatorică îl situează printre întemeietorii microbiologiei și fondator al învățământului microbiologic și anatomo-patologic veterinar în țara noastră.

Un cercetător romîn care trebuie amintit aici, pentru însemnata sa contribuție la progresul microbiologiei, este Constantin Levaditi. S-a născut la Galați în 1874 și a murit la Paris (1953). Rămas de timpuriu orfan, el este crescut de o mătușă a sa care era îngrijitoare la spitalul Brîncovenesc. Urmează medicina la București și în 1897 îl găsim preparator al lui Victor Babeș, unde asimilează primele cunoștințe de microbiologie și anatomie patologică. Pleacă însă curînd (1898) în străinătate, unde lucrează pe lîngă marii maeștri ai timpului, Charrin, Roux și Ehrlich, desăvîrșindu-și pregătirea în laboratorul lui Mecinikov. Elev al unor asemenea maeștri, devine curînd un cercetător desăvîrșit, dezvoltînd, în tot cursul vieții sale, o activitate științifică prodigioasă. Posedînd cunoștințe vaste de histologie patologică, microbiologie, imunologie și chimioterapie, el a abordat cele mai diverse probleme, contribuind la rezolvarea lor. Astfel, în problema sifilisului uman a pus la punct o tehnică de colorare a parazitului în țesuturi și a adus contribuții importante la diagnosticul bolii și la tratamentul ei prin săruri de bismut.

Scanned with OKEN Scanner

Constantin Levaditi (1874 — 1953)

El a arătat, de exemplu, că antigenul fixator faţă de anticorpii sifilisului se găseşte nu numai în organele provenind de la bolnavi, ci şi în cordul de bou. In ceea ce priveşte terapia sifilisului, Levaditi a demonstrat, pentru prima oară, valoarea sărurilor de bismut, precum şi a unor metale, cu care bismutul se învecinează în clasificarea lui Mendeleev, fapt ce prezintă o valoare practică şi teoretică considerabilă. O parte însemnată din activitatea sa a închinat-o virusurilor filtrabile, contribuind în aşa măsură la dezvoltarea studiului acestei ramuri a microbiologiei încît, pe bună dreptate, trebuie socotit ca unul din fondatorii ştiinţei despre virusuri. El s-a ocupat de poliomielită, demonstrînd natura virotică a acestei infecţii şi lămurind unele aspecte epidemiologice de importanţă deosebită, a studiat virusul vaccinal, punînd în evidenţă posibilitatea sa de transformare în neurovaccin, a cercetat virusul rabic, virusul herpetic, a introdus, împreună cu Nicolau, ultrafiltrarea în studiul virusurilor, a descoperit metode noi şi ingenioase de cercetare a acestor vieţuitoare.

El era stăpînit de o nemărginită dragoste pentru ştiinţă, de o nesecată curiozitate, de un entuziasm totdeauna tineresc. Aceste sentimente le împrumută şi celor din jur şi cei care au avut fericirea să stea în preajma acestui om îşi amintesc de acest lucru. Imi amintesc, de exemplu, cu cît entuziasm mi-a vorbit, în 1938, de cristalizarea virusurilor filtrabile, cu cîtă bucurie mi-a arătat imaginile date de microscopul cu lumina fluorescentă, cu ce interes recepţiona orice noutate în domeniul ştiinţei.

Levaditi a trăit departe de ţara sa, dar a păstrat totdeauna pentru ea o nespusă dragoste. Casa sa de la Paris era un colţ din patrie. Avea pentru romînii veniţi la studii o deosebită solicitudine, o vie dorinţă de a-i instrui cît mai bine, pentru ca ei să fie cît mai utili patriei sale, căci el a rămas pînă la moarte un mare romîn.

Regimul nostru democrat-popular acordă o deosebită atenţie omului şi sănătăţii publice, iar o dată cu aceasta cercetărilor din domeniul micro-

biologiei. Această atenţie se traduce prin crearea de noi institute, cum sînt: Institutul de inframicrobiologie de pe lîngă Academia R.P.R., Institutul de patologie şi igienă animală de pe lîngă Ministerul Agriculturii, prin înfiinţarea unor noi laboratoare de bacteriologie veterinară regionale, prin dotarea cu material şi personal a vechilor institute, cum sînt Institutul „dr. I. Cantacuzino" şi Institutul „Pasteur".

In aceste condiţii, microbiologia romînească va face noi progrese, contribuind astfel, pe de o parte, la mărirea tezaurului ştiinţific al umanităţii, pe de altă parte, la rezolvarea problemelor puse în legătură cu microbiologia, practicii *medicale, veterinare, agricole* şi *industriale.*

Scanned with OKEN Scanner

DEFINIȚIA ȘI CONȚINUTUL MICROBIOLOGIEI

Microbiologia este știința care se ocupă, așa cum arată și analiza etimologică a cuvîntului (*„mikros"* = mic, *„bios"* = viață, *„logos"* = vorbă, discurs), cu cercetarea viețuitoarelor mici, mai precis, invizibile cu ochii liberi și care sînt cunoscute sub numele generic de microbi.

Termenul de microb nu are un înțeles unic. Unii cercetători consideră cuvîntul microb sinonim cu cel de bacterie, alții îi dau un sens mai larg, dar chiar și aceștia nu admit că un virus filtrabil este un microb. Astfel, Șt. Nicolau distinge virusurile de bacterii și folosește, pentru primele, termenul de inframicrobi.

Ținînd seama de înțelesul etimologic al cuvîntului microb, precum și de sensul inițial pe care i l-a dat creatorul său, *noi înțelegem prin microb orice viețuitor invizibil cu ochii liberi care, din punct de vedere morfologic, este constituit dintr-o singură celulă sau putînd avea chiar o structură subcelulară. Dimensiunile și structura morfologică decid deci încadrarea unui viețuitor printre microbi. Protozoarele, bacteriile, virusurile filtrabile, ciupercile microscopice sînt, conform acestei definiții, microbi.*

Termenul de microb nu figurează în sistematica viețuitoarelor. El poate fi considerat similar cu cuvîntul protist, de la grecescul *„protistos"* care înseamnă cel dintîi. Primul nume (microb) se inspiră din dimensiunile acestor viețuitoare, cel din urmă (protist) se referă la momentul apariției lor pe pămînt. Microbii sau protistele au comun dimensiunile, structura lor simplă, dar pot diferi între ei printr-o serie de alte caractere morfologice și fiziologice, de unde necesitatea clasificării lor.

POZIȚIA MICROBILOR ÎN SISTEMATICA VIEȚUITOARELOR

Unii cercetători au propus ca viețuitoarele microscopice (protozoare și ciuperci) să constituie al treilea regn, alături de regnurile animal și vegetal. Acest al treilea regn a fost numit regnul protistelor și în el sînt încadrate, de obicei, bacteriile și alte microorganisme și socotim nimerit ca el să cuprindă organismele microscopice și submicroscopice și să se numească, pentru acest motiv, regnul protistelor sau microbilor. Acest punct de vedere

este susținut, recent, printre alții, și de cercetătorul sovietic V a g a, care propune ca acest al treilea regn să grupeze viețuitoarele care nu au caractere nete vegetale sau animale și să fie numit regnul ciupercilor.

Schema clasificării protistelor sau microbilor

PROTISTE SAU MICROBI

- Protozoare *(Protozoa)*
  - Rhizopoda
  - Mastigophora
  - Sporozoa
  - Ciliata
- Protofite *(Protophita)*
  - Schizophyceae sau Algae
    - Cyanophyceae
    - Phytoflagellaceae
    - Chlorophyceae
    - Pheophyceae
    - Rhodophyceae
  - Schizomyceae
    - Bacterii sau Schizomycete
    - Virusuri filtrabile
    - Borrelomycetes sau Paramycetes
    - Rickettsii
    - Ciuperci

În cele ce urmează vom arăta pe scurt caracterele generale ale grupelor în care se încadrează speciile patogene.

Protozoarele sînt viețuitoare monocelulare. Celula prezintă un nucleu distinct de protoplasmă. Mișcarea celulelor, în mediul ambiant, se face, la unele grupe, prin pseudopode, la altele, prin flageli. Modul de multiplicare variază ; pe lîngă diviziunea directă se întîlnesc și procese sexuale și de conjugație.

Modul de nutriție este variat; pentru unele grupe, nutriția este de tip osmotic (absorbția principiilor nutritivi din mediu), pentru altele de tip holozoic (înglobarea particulelor nutritive din mediul ambiant și dezintegrarea lor în interiorul citoplasmei). Unele specii ale încrengăturii sînt libere, altele — destul de numeroase — parazite, producînd stări morbide la om sau la animale. Astfel, dintre cele patru clase în care sînt împărțite protozoarele *(Rhizopoda, Mastigophora, Sporozoa și Ciliata)*, două cuprind specii patogene.

În clasa *Mastigophora* se găsesc tripanosomele și trichomonadele, care produc diverse boli la om și animale, iar în clasa *Sporozoa* diversele specii de coccidii, precum și speciile de hemosporidii (paraziți ai elementelor figurate ale sîngelui).

Pe lîngă protozoarele parazite există și protozoare comensale, care folosesc produsele de eliminare ale unor gazde, precum și protozoare simbiote, care se găsesc în intimitatea organismului gazdei, dar nu-i produc nici o tulburare.

Schizomyceele sînt plante monocelulare, cu organizație simplă. Spre deosebire de *Schizophyceae*, ele nu posedă pigmenți fotosintetizanți și sînt de regulă heterotrofe.

Nucleul lor e în general nediferențiat.

Ele, neposedînd pigmenți fotosintetizanți, nu pot utiliza energia luminoasă și își acoperă necesitățile energetice prin procesele chimice exotermice pe care le provoacă.

Importanța studiului schizomyceelor se datorește, pe de o parte, bolilor pe care unele din specii le produc la animale și la plante, iar, pe de altă parte, enormei lor răspîndiri în natură și multiplelor procese de transformare, pe care, prin activitatea lor fermentativă, le impun materiei în general, și celei organice, în special.

Schizomyceele încadrează viețuitoare extrem de variate ca morfologie și fiziologie și de aici necesitatea didactică de a le împărți în mai multe grupe sau clase. Numărul și numele acestor grupe sau clase variază de la un cercetător la altul. Noi descriem grupele de schizomycee (microbi fără clorofilă sau alți pigmenți fotosintetizanți) care prezintă o importanță mai mare pentru medicină. Aceste grupe sînt :

1. bacteriile sau schizomycetele
2. virusurile filtrabile
3. borrelomycetele sau paramycetele
4. rickettsiile
5. ciupercile

1. *Bacteriile sau schizomycetele* sînt plante monocelulare, cu o structură simplă, omogenă și avînd un nucleu nediferențiat de citoplasmă. Multiplicarea se face exclusiv prin sciziparitate. Nutriția lor este de tip osmotic.

Majoritatea speciilor sînt libere. Există însă și specii patogene, parazite — obligatorii sau facultative — care produc infecții la om sau animale, cum sînt : holera asiatică, ciuma, antraxul, tetanosul, tuberculoza etc.

Bacteriile, prin procesele fermentative ca și prin infecțiile pe care le produc, au un rol important în viața omului și de aceea studiul lor a luat o mare extindere, creîndu-se, pentru cercetarea lor, un capitol aparte în cadrul microbiologiei, și anume bacteriologia.

Mai mult încă, în cadrul bacteriologiei au luat naștere discipline care cercetează bacteriile avînd legături strînse cu anumite sectoare din activitatea omenească.

Se cunosc astăzi trei ramuri principale ale bacteriologiei și anume :

— bacteriologia industrială, care studiază bacteriile folosite în diverse industrii ;

— bacteriologia agricolă, care cercetează speciile bacteriene importante pentru agricultură ;

— bacteriologia medicală, care se ocupă cu cercetarea bacteriilor patogene pentru om și animale.

2. *Virusurile filtrabile, ultravirusurile sau inframicrobii* pot fi considerate convențional plante. Aceste viețuitoare stau la marginea vieții, la limita dintre animat și neanimat. Avînd dimensiuni foarte reduse, 10—300 milimicroni, ele traversează filtrele impermeabile pentru bacterii și nu sînt vizibile la microscopul cu lumină. Ele nu se găsesc libere în natură, ci numai ca parazite obligatorii în celula vie, care pune la dispoziția virusurilor nu numai principii nutritivi, dar și echipamentul enzimatic din care și cu care acestea construiesc o materie organică proprie și deosebită de a gazdei.

Scanned with OKEN Scanner

Virusurile filtrabile au, în patologia animală și vegetală, o importanță deosebită, producînd, la cele mai diverse viețuitoare, infecții grave ca turbarea, febra aftoasă, vărsatul, poliomielita, mozaicul tutunului etc.

3. *Borrelomycetele* sau *paramycetele* sînt viețuitoare monocelulare, polimorfe, filtrabile, dar vizibile la microscopul cu lumină și cultivabile în medii inerte.

Morfologic, ele se apropie de ciuperci. În culturile tinere, într-adevăr, ele formează micelii de lungimi variabile, pe traiectul cărora se constituie granule mici, rotunde, avînd o afinitate accentuată pentru coloranți. Aceste granule reprezintă foarte probabil elementul filtrabil și ele singure se găsesc în culturile vechi.

Se cultivă, ca și unele bacterii patogene, în bulion sau agar cu ser.

Nu se cunosc bine, pînă în prezent, în această grupă de viețuitoare, decît două specii și anume: agentul peripneumoniei bovideelor și agentul agalaxiei contagioase a oilor și caprelor.

S-au mai găsit germeni asemănători la cîine, șobolan, șoarece și chiar om, dar aceștia sînt puțin studiați.

4. *Rickettsiile* sînt microbi polimorfi, de dimensiuni variind de la 0,2 la 1 η, colorabili și vizibili la microscop. Nu se cultivă, de regulă, pe medii inerte. Paraziți obligatorii ai celulei vii. Patogene pentru om și animale, la care se transmit, de regulă, prin gazde intermediare — insecte.

Unele sistematici au încadrat în clasa *Bacteria* sau *Schizomycetes,* virusurile filtrabile și rickettsiile ca ordine suplimentare ale acestei clase. Astfel, Krasilnikov (1949) include în ordinul *Chlamidozoa* atît virusurile cît și rickettsiile, iar în determinatorul lui Bergey (1948) sînt create două ordine suplimentare, ordinul *Virales* pentru virusurile filtrabile și ordinul *Rickettsiales,* pentru rickettsii.

Morfologia și biologia virusurilor filtrabile, precum și a rickettsiilor, fiind mult diferite de ale bacteriilor, este necesar ca aceste două grupe de viețuitoare să fie cercetate aparte și să constituie clase separate.

5. *Ciupercile* sînt viețuitoare, în general, microscopice, constituite dintr-un aparat vegetativ, adică un tal, miceliu sau filament și un sistem de reproducere foarte variat la diversele specii și grupe de specii.

Aparatul vegetativ, adică miceliul, este un tub în care se mișcă masa citoplasmatică și nucleii celulari. Circulația masei citoplasmatice, în tubul micelial, se face, chiar și la ciupercile cu micelii septate, deoarece pereții despărțitori sînt prevăzuți cu un por prin care poate trece citoplasma și nucleii. Tubul micelian prezintă, spre deosebire de bacterii, ramificații laterale adevărate și nuclei tipici. Se multiplică prin înmugurire (burjonare) sau sciziparitate, dar se întîlnesc și procese de conjugație sau sexuale, ceea ce, la fel, deosebește net ciupercile de bacterii.

Procesele sexuale îmbracă, la unele specii de ciuperci, aspecte particulare, cum sînt dicariofaza și tetrapolaritatea și care nu se întîlnesc de loc sau rar la alte viețuitoare. Sînt lipsite de clorofilă sau alt pigment fotosintetizant și-și procură carbonul din alți compuși decît bioxidul de carbon. Azotul îl pot lua din compușii organici sau anorganici, cum sînt nitrații și sărurile de amoniu.

Produc numeroase procese fermentative și au multiple întrebuințări în industrii. Astfel, fermentația zahărului din struguri ca și din alte produse vegetale și transformarea lui în alcool este realizată de o specie levu-

riformă de ciuperci. Fabricarea pîinii, dospirea ei, se realizează tot prin acţiunea ciupercilor levuriforme.

Unele ciuperci, cum sînt cele din genul *Penicillium,* de exemplu, sînt folosite pentru a obţine substanţe antibiotice, care sînt astăzi folosite, pe o scară largă, în tratamentul bolilor bacteriene la om şi animale.

Ciupercile — unele specii — alterează diverse produse vegetale, fructe, legume şi produc boli contagioase la plante.

Unele specii de ciuperci produc procese morbide la om şi la animale.

*

Microbiologia, dacă s-ar conforma înţelesului larg al cuvîntului, ar trebui să se ocupe cu studiul vieţuitoarelor aparţinînd protozoarelor şi protofitelor, adică de toţi microbii, indiferent dacă sînt paraziţi sau nu. Tradiţia face însă ca învăţămîntul parazitologic, care cercetează paraziţii animali multicelulari, să cuprindă şi studiul vieţuitoarelor patogene, unicelulare şi microscopice, din încrengătura protozoarelor.

Paraziţii vegetali, adică virusurile filtrabile, bacteriile şi ciupercile, cu alte cuvinte grupa schizomyceelor, pot fi şi trebuie cercetate în cadrul microbiologiei, care, pentru acest motiv, ar fi mai corect să se numească parazitologie vegetală, în sensul de „studiul paraziţilor de origine vegetală", actuala parazitologie urmînd a se numi parazitologie animală, în sensul de „studiul paraziţilor de origine animală".

De altfel, medicina sovietică a creat termeni deosebiţi pentru bolile produse de cele două categorii de germeni. Ea numeşte boli de invazie maladiile produse de paraziţi animali şi infecţii pe cele produse de microbi (bacterii, virusuri).

Nomenclatura propusă de noi ar fi mai potrivită conţinutului materiei şi nu ar da loc la confuzii. Într-adevăr, învăţămîntul intitulat astăzi parazitologie ar trebui să se ocupe, dacă s-ar respecta întregul înţeles al cuvîntului, cu toţi paraziţii, indiferent dacă sînt vegetali sau animali, vizibili sau invizibili, iar cel intitulat microbiologie, cu toţi microbii, indiferent dacă sînt patogeni sau nu, animali sau vegetali. Acest lucru ar fi foarte greu de realizat în cadrul unei catedre şi chiar dacă s-ar realiza el nu ar corespunde scopurilor practice şi didactice.

Nomenclatura propusă o găsim deci potrivită conţinutului materiilor care trebuie predate în învăţămîntul medical, la catedrele de microbiologie şi parazitologie.

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA a II-a

BACTERIOLOGIE GENERALĂ

Scanned with OKEN Scanner

Clasa SCHIZOMYCETES, Nägeli, 1857

Sinonime: BACTERIA, Cohn, 1872

CARACTERE GENERALE

1. Bacteriile sau schizomycetele sînt plante unicelulare, ceea ce înseamnă că o singură celulă reprezintă şi reproduce toate atributele speciei, neavînd nevoie, în realizarea manifestărilor sale vitale, de concursul altor celule.

2. Celula bacteriană se prezintă ca o masă omogenă. Ea nu are, în înţelesul obişnuit al cuvîntului, un nucleu distinct, prin afinităţile sale tinctoriale, de citoplasmă. Totuşi, formaţii cromatice, care pot fi considerate ca aparţinînd şi constituind un nucleu, au putut fi puse în evidenţă în celula bacteriană prin metode speciale de examinare.

3. Celula bacteriană nu prezintă o mobilitate interioară, care să se traducă, de exemplu, ca la amibe, prin modificarea formei celulare. Mobilitatea, la speciile mobile, se datoreşte unor organite numite cili sau flageli.

4. Forma celulei variază, bacteriile prezentînd un accentuat polimorfism. Se recunosc totuşi, în multiplicitatea formelor sub care se prezintă bacteriile, patru aspecte morfologice principale şi anume:

a) forma rotundă, numită *coc*;
b) forma alungită, numită *bacil*;
c) forma încurbată, numită *spiril* sau *vibrion*;
d) forma regulat ondulată, numită *spirochet*.

5. Bacteriile, afară de cîteva excepţii, nu au clorofilă sau alt pigment asimilator şi, în consecinţă, nu pot folosi energia luminoasă. Ele îşi procură energia necesară sintezelor celulare şi celorlalte manifestări vitale dezintegrînd diverse substanţe chimice prin intermediul fermenţilor.

Substanţele pe care le pot folosi ca alimente plastice sau energetice variază în limite foarte largi, începînd cu elementele simple ca azotul, sulful sau hidrogenul şi sfîrşind cu marile molecule, ternare sau cuaternare.

6. Bacteriile se înmulţesc prin sciziparitate, adică prin diviziune directă. Se admite, în general, că diviziunea nu este precedată de procese sexuale sau de conjugaţie. Unii cercetători afirmă însă că asemenea procese ar putea interveni în anumite faze din dezvoltarea unei bacterii şi ei au descris atît procese de conjugaţie, cît şi formarea unor celule sexuale diferenţiate — mascule şi femele.

7. Unele bacterii pot forma spori, dar aceştia nu constituie, ca la ciuperci, un mijloc de înmulţire, ci numai de conservare a speciei.

Scanned with OKEN Scanner

MORFOLOGIA BACTERIILOR

FORMA BACTERIILOR

Bacteriile se pot prezenta sub formă de coc, bacil, spiril, sau spirochet. Cocii, priviți în spațiu, nu sînt totdeauna sferici, iar bacilii nu sînt totdeauna cilindrici. Intr-adevăr, cercetîndu-se a treia dimensiune a bacteriilor, în afară de axul longitudinal și transversal, s-a constatat că, de exemplu, cocii pot avea și o formă parțial poliedrică, iar bacilii pot fi plați. Formele bacilare plate, cum este, de exemplu, bacilul rujetului, produc, prin agitația mediilor lichide, valuri caracteristice.

Forma celulei nu are o fixitate absolută, în sensul că indivizii unei specii rotunde pot prezenta și forme ușor alungite, iar cei ai unei specii bacilare pot conține forme cocoide sau chiar și alte aspecte care se abat de la tipul normal al speciei. Aceste forme aberante sînt mai des întîlnite la unele specii ca la altele. *Bacterium necrophorum,* de exemplu, prezintă în culturi o multiplicitate de aspecte, adică un polimorfism accentuat. In culturile tinere celulele bacteriene ale speciilor reputate ca nepolimorfe sînt, de regulă, uniforme, dar această uniformitate se pierde pe măsură ce cultura se învechește. In unele formații culturale, cum sînt coloniile fiice ale bacilului cărbunelui, polimorfismul germenilor este foarte accentuat. Putem întîlni aici indivizi în formă de biscuit, forme cocoide mari, precum și grămezi, aglomerări de celule neseparate între ele, constituind așa-numitele plasmodii sau symplaste.

Mediile de cultură influențează forma bacteriilor. Bacilul rujetului, de exemplu, este un germen a cărui formă este foarte mult influențată de constituția mediului. In unele medii, el formează filamente — formații lungi — filiforme, ondulate, în lungul cărora nu observăm linii de demarcație transversală, bacilul alungindu-se, fără să se dividă. In alte medii, bacilii aceleiași tulpini se prezintă sub forma unor bastonașe scurte și fine, filamentele fiind foarte rare și scurte. Prezența unor substanțe, în mediu, provoacă, în mod constant, o variație de forme, chiar la bacteriile care, în mediile obișnuite, sînt foarte uniforme. O asemenea substanță și cea mai cercetată este clorura sau carbonatul de litiu, așa cum a observat G a m a l e i a încă din anul 1894.

Scanned with OKEN Scanner

Semnificaţia formelor aberante sau heteromorfe, cum le-a numit G a m e l e ī a, care apar în culturile vechi, în coloniile fiice sau în mediile cu carbonat de litiu (K o l b m ü l l e r, 1936), nu este încă pe deplin lămurită. Unii bacteriologi le consideră ca forme degenerate, alţii, mărturia existenţei unui ciclu evolutiv. Fiecare aspect celular reprezintă, după aceşti din urmă autori, o fază din evoluţia ciclică a bacteriei respective. Diversitatea formelor întîlnite în coloniile fiice ale bacilului cărbunelui şi apariţia, în aceste colonii, a unor variante bacteriene neexistente în cultura iniţială au făcut pe N. S t a m a t i n să admită că formele aberante urmează sau preced unele fenomene de conjugaţie. In coloniile fiice, se nasc, într-adevăr, elemente bacilare cu proprietăţi noi. Astfel, în coloniile fiice ale tulpinilor sporulate de bacilii cărbunelui se pot găsi variante care au pierdut definitiv proprietatea de a sporula ; în coloniile fiice ale tulpinilor de bacilii tuberculozei se găsesc variante care vegetează mai bine, decît tulpina iniţială, pe anumite medii de cultură. Formele aberante din coloniile fiice nu pot fi celule degenerate sau moarte, cum le-au considerat monomorfiştii, în frunte cu F. C o h n şi R. K o c h, fondatorii şcolii monomorfiste. S-a constatat, într-adevăr, pentru o variantă asporogenă de bacilii cărbunelui, că în timp ce în coloniile primare, care sînt constituite din germeni cu aspect normal, nu mai era nici o celulă vie, în coloniile fiice, cu forme aberante, existau bacterii vii şi cultivabile.

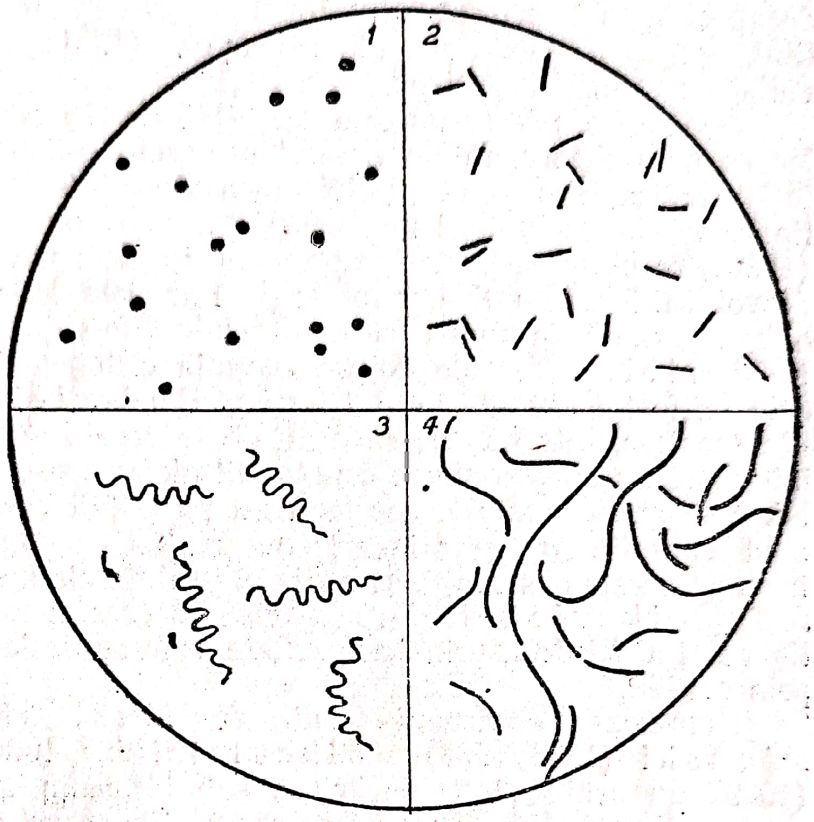


Fig. 2 — Diverse forme de bacterii
1 — coci; 2 — bacili; 3 — spirocheţi; 4 — filamente

In concluzie, bacteriile prezintă, din punct de vedere al formei, posibilităţi importante de variaţie. Multiplicitatea formelor demonstrează plasticitatea bacteriilor, capacitatea lor de a lua forma care se adaptează mai bine la diversele medii biologice.

MULTIPLICAREA BACTERIILOR

Bacteriile sau schizomycetele, aşa cum arată şi acest din urmă nume, sînt considerate vieţuitoare care se multiplică exclusiv prin sciziparitate, adică prin diviziune directă. O celulă, ajunsă la un anumit stadiu de dez-

voltare şi de maturitate fiziologică, se împarte în două, dînd astfel două celule fiice, care se pot separa definitiv sau pot rămîne legate între ele prin membrana celulară, constituind, în acest caz, aşa cum vom vedea imediat, lanţuri.

Diviziunea celulei este precedată de anumite modificări ale constituenţilor celulari, de o diviziune a nucleului, aşa cum afirmă unii cercetători, de apariţia în interiorul celulei a unor formaţii precelulare, care ar constitui, aşa cum se exprimă Muromţev (1951), faza embrionară de dezvoltare a celulei bacteriene.

Diviziunea directă nu este acceptată de toţi cercetătorii ca unicul mijloc de multiplicare. Polimorfismul bacterian constituie, după unii cercetători, o indicaţie că, pe lîngă diviziunea directă, intervin, în procesul de multiplicare, alte modalităţi mai complexe. Löhnis (1917), Enderlein (1925), socotesc că bacteriile prezintă un ciclu vital, că ele trec, în cursul dezvoltării lor, prin diverse forme şi că ar avea, în evoluţia lor ciclică, chiar o fază sexuată de multiplicare cu celule diferenţiate (spermit şi oit, după Enderlein). Teoriile despre evoluţia ciclogenetică a bacteriilor, astfel cum au fost formulate de Löhnis, Enderlein şi alţii, sînt fixiste. Ele socotesc, într-adevăr, că ciclurile se repetă sub impulsul unor factori interni şi nu sînt, conform concepţiei miciuriniste, sub dependenţa mediului. Sub această formă, aceste teorii nu pot fi acceptate, ele necorespunzînd realităţii. Aruncînd însă la o parte tot cu ceea ce concepţia fixistă a încărcat aceste observaţii, se poate păstra din ele un nucleu raţioal şi poate real (Jolkevici, 1952), şi anume observaţia că bacteriile se pot multiplica şi altfel decît prin sciziparitate, cum ar fi, de exemplu, multiplicarea prin gonidii.

Numeroase observaţii făcute de Maslenikova, Kosmodamianski (1936, 1937), Jolkevici (1925, 1926, 1952), Gamaleia (1939) au arătat, într-adevăr, că sub influenţa unor factori disgenetici ca sărurile de litiu, penicilina, razele Roentgen etc., apar, în culturile diverselor specii bacteriene, formaţii celulare mari, în interiorul cărora se găsesc granulaţii mici şi numeroase. Asemenea formaţii au fost întîlnite chiar pe medii obişnuite, în culturile de *Bacillus anthracis*. Aceste formaţii celulare, de dimensiuni neobişnuite, de formă rotundă sau oval-fusiformă, se apropie de gonidangiile întîlnite la ciuperci (*Saprolegnia ferax*, de exemplu), iar granulaţiile interne de sporii sau gonidiile ciupercilor. Granulaţiile din interiorul formelor gigante ar putea reprezenta, în lumina teoriilor emise de O. B. Lepeşinskaia, formele precelulare capabile să evolueze spre celula normală a speciei respective. Jolkevici (1952) afirmă, în această privinţă, că, într-adevăr, formele bacteriene gigante pot evolua spre celulele speciei din care provin, fie prin fragmentarea lor, fie prin formarea unui mugure terminal, fie prin transformarea lor într-un gonidangiu cu multe gonidii. Gonidiile se eliberează din gonidangiu prin ruperea membranei acestuia din urmă şi ele pot da naştere, în medii adecvate, la celule. Formele gigante din culturi, în conformitate cu aceste concepţii, reprezintă elementele unui alt mod de înmulţire decît diviziunea directă.

In afară de argumentul morfologic mai există, în sprijinul existenţei unui alt mod de înmulţire decît sciziparitatea, un argument filogenetic. Intr-adevăr, înrudirea morfologică şi biologică dintre ciuperci şi unele

Scanned with OKEN Scanner

grupe de bacterii, cum sînt cele din familia *Bacillaceae,* este prea mare pentru ca la acestea din urmă să nu găsim, cel puţin sub o formă rudimentară, unele din organitele şi formele de multiplicare ale ciupercilor.

In fine, s-a admis de unii cercetători, şi tot ca o consecinţă a înrudirii cu ciupercile, că unele specii bacteriene s-ar multiplica şi prin înmugurire. Acest mod de multiplicare nu este însă complet dovedit.

In concluzie, existenţa unor alte moduri de înmulţire decît sciziparitatea este încă discutată. Ceea ce pare definitiv stabilit este că aceste alte moduri, chiar dacă există, nu apar decît în anumite condiţii de viaţă şi că modul obişnuit de multiplicare al bacteriilor îl constituie sciziparitatea sau diviziunea directă.

MODUL DE GRUPARE A CELULELOR BACTERIENE

Gruparea celulelor bacteriene este caracteristică pentru unele specii; unii coci sau bacili, de exemplu, se grupează cîte doi, constituind *diplococi*

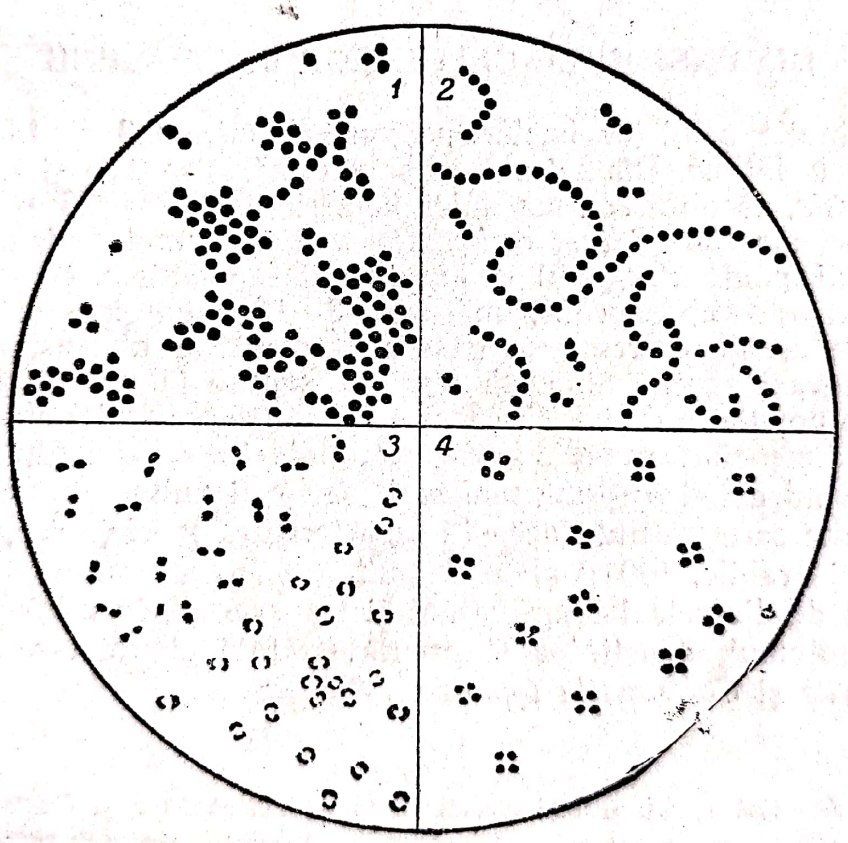


Fig. 3 — Diverse moduri de grupare ale bacteriilor
1 — coci izolaţi; 2 — streptococi; 3 — diplococi; 4 — tetrade

sau *diplobacili;* cocii şi bacilii pot forma lanţuri lungi, datorită faptului că celulele rezultate din diviziune nu se separă complet una de alta. Aceste formaţii în lanţ sînt numite, respectiv, *streptococi* sau *streptobacili.* Cocii care se divid în acelaş plan, însă în două direcţii ale spaţiului, pot constitui grupe de cîte patru celule numite *tetrade.* Unii coci datorită diviziunii

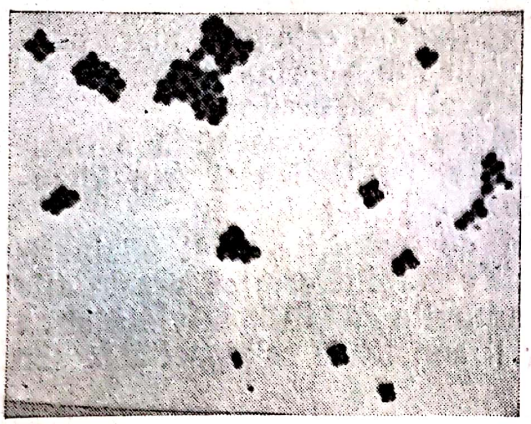


Fig. 4 — Coci grupaţi cîte patru sau neregulat

lor în cele trei direcţii ale spaţiului constituie cuburi de cîte opt celule, patru într-un plan şi patru pe alt plan, numite *sarcina.* Celulele unor specii bacteriene de tip bacilar se pot alungi foarte mult, fără ca în lungul bacilului să se observe membrane separatoare transversale care să permită distincţia mai multor indivizi. Asemenea formaţii poartă numele de *filamente.* Unii cercetători au descris la bacterii o formaţie specială: mai multe celule se contopesc într-o masă, pierzîndu-şi astfel individualitatea. Această grupare este numită *plasmodiu* sau *symplast.*

În concluzie, bacteriile pot constitui grupuri. Modul de grupare poate fi un criteriu de diferenţiere a genurilor sau speciilor.

DIMENSIUNILE CELULELOR BACTERIENE

Dimensiunile celulelor bacteriene variază între 0,3 şi 15 μ lungime şi 0,1 şi 1,5 μ lăţime. Diametrul cocilor variază între 0,73 şi 1,25 μ *Brucella melitensis,* socotită cea mai mică bacterie, măsoară 0,3 μ lungime şi 0,1 μ lăţime, iar *Clostridium oedematis maligni,* unul dintre marii germeni patogeni, poate atinge 10 μ lungime şi 1 μ lăţime. *Clostridium putrefaciens,* un anaerob saprofit, măsoară 3—15 μ lungime şi 0,5—0,7 μ lăţime. Între aceste extreme se găsesc germeni de dimensiuni intermediare. La aceeaşi specie, dimensiunile sînt supuse la variaţii importante. Astfel, într-o populaţie de bacilii cărbunelui se găsesc multe elemente lungi de 6—8 μ (dimensiunea medie a speciei), alături de celule puţin mai lungi decît late, avînd astfel o formă mai mult sau mai puţin rotundă. Filamentele, la speciile care prezintă această caracteristică morfologică, pot atinge lungimi considerabile, 100 μ şi mai mult.

În afară de diametrul longitudinal şi transversal, la unele specii s-au determinat volumul, densitatea şi greutatea. Iată cifrele obţinute pentru *Vibrio cholerae* şi *Salmonella typhosa.*

Tabelul 1

Dimensiunile, densitatea, volumul şi greutatea la *Vibrio cholerae* şi *Salmonella typhosa*

	Vibrio cholerae	Salmonella typhosa
Lungimea (în μ)	2	2,1
Lăţimea (în μ)	0,4	0,7
Greutatea specifică	1,30	1,14
Volumul unei celule (în ml)	$2,5 \times 10^{-13}$	$7,7 \times 10^{-13}$
Greutatea unei celule (în g)	$3,5 \times 10^{-13}$	$8,7 \times 10^{-13}$

Scanned with OKEN Scanner

Greutatea unei bacterii, aşa cum se vede din cifrele de mai sus, este foarte mică. Pentru a avea o imagine mai clară a greutăţii unei celule, trebuie să spunem că într-un gram de bacterii umede se găsesc, după Cohn, 636 miliarde de germeni sau chiar mai mulţi.

Greutatea specifică a bacteriilor depăşeşte, în general, cifra 1, ceea ce înseamnă că aceste celule sînt mai grele decît un volum egal de apă, la temperatura de 4°C. Pentru acest motiv, bacteriile se sedimentează atunci cînd sînt puse în suspensie într-un lichid care nu depăşeşte cu mult densitatea 1. S-a constatat însă că bacteriile, care formează o membrană la suprafaţa mediilor lichide, au o densitate mai mică decît apa. *Bacillus subtilis*, de exemplu, care formează membrană pe suprafaţa mediilor lichide, are, în aceste medii, densitatea cuprinsă între 0,77 şi 0,965. Pe agar, aceleaşi celule au însă o densitate mai mare ca 1. Această constantă fizică variază deci în funcţie de mediul ambiant.

Densitatea bacteriilor se determină cîntărind în tuburi de sticlă un volum cunoscut de bacterii. 1 ml de germeni este, în general, mai greu ca 1 g.

Masa unei celule bacteriene se află împărţind volumul obţinut prin centrifugarea unei suspensii bacteriene prin numărul total al germenilor ce se găsesc în depozit. Cifra astfel obţinută este relativă, căci în volumul considerat, pe lîngă celule bacteriene întregi, se mai găsesc resturi de celule bacteriene, diverse produse de secreţie ca substanţe mucilaginoase, capsulare etc., precum şi o cantitate oarecare de apă.

În concluzie, dimensiunile bacteriilor sînt supuse, ca şi celelalte caractere morfologice, la însemnate variaţii.

SPORUL BACTERIAN

Sporul este o formaţie prezentă numai la unele specii bacteriene. El este rotund sau oval şi ia naştere din forma vegetativă. Pus în condiţii favorabile de germinaţie, sporul dă naştere la o formă vegetativă identică cu aceea care l-a produs. Sporul nu se înmulţeşte; el este forma de conservare a bacteriei, după cum sămînţa este forma de conservare a plantelor. În comparaţie cu forma vegetativă, sporul are un metabolism mult mai redus, este mai rezistent faţă de diverşi factori nocivi din mediul înconjurător şi se impregnează mai greu cu soluţiile colorante. Sporii bacterieni au fost semnalaţi întîi de Pasteur şi studiaţi, apoi, amănunţit. de R. Koch (1876).

MORFOGENEZA

Forma vegetativă, adică forma de creştere şi multiplicare a bacteriei, se poate transforma, la speciile sporogene, într-un spor. Formarea sporului, pe plan morfologic, este precedată de o acumulare de cromatină într-un punct al celulei (Knaysi şi col. 1947). Acest punct la unele specii — *Bacillus anthracis*, de exemplu — este situat central, la altele — *Clostridium chauvei, Cl. oedematis maligni* — subterminal, iar la altele — *Bacillus tetani* şi germenii tetanomorfi — terminal. Punctul de cromatină constituie sîmburele sporului şi el ar corespunde, după unii autori, nu-

Scanned with OKEN Scanner

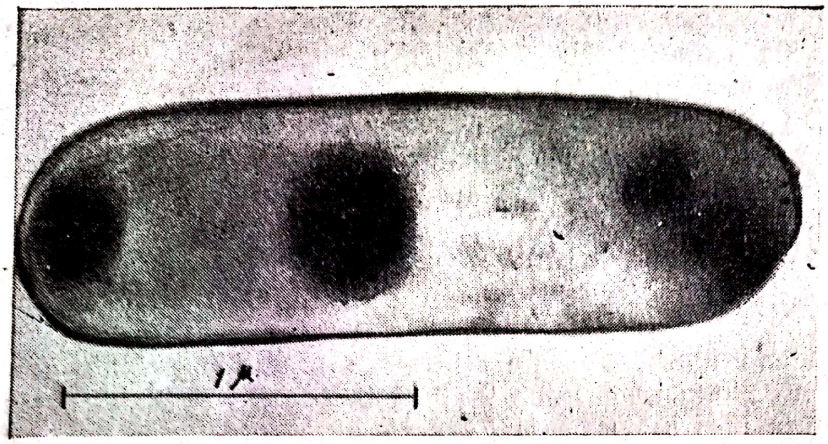


Fig. 5 — Faza inițială de formare a sporului la *Bacillus mycoides*. Imagine electronică (după **Knaysi** și **Baker**)

celului. El se înconjoară de un strat subțire de citoplasmă, din care apoi se diferențiază membrana sporului.

Sporul complet format, la examenul microscopic direct, se prezintă ca un punct refringent. Metodele uzuale de colorare nu-l pun în evidență sau îi colorează numai conturul. Coloranții energici, fuxina încălzită, de exemplu, pătrund în spor și îl colorează, el prezentîndu-se, în acest caz, ca un oval sau coc uniform colorat. Rezistența sa față de acțiunea de penetrație a coloranților se datorește, după unii autori, componenților lipidici din membrană, după alții constituției și densității materiei din sîmburele central. Unii autori observă, în sprijinul celei din urmă ipoteze, că sîmburele central, chiar din momentul constituirii sale, înainte deci ca sporul să fie definitiv format, nu este pătruns de soluțiile colorante.

SOARTA FORMEI VEGETATIVE DUPĂ SPORULARE

Sporul concentrează, într-un volum redus, toate componentele esențiale ale celulei. Ar fi de așteptat ca în momentul cînd el s-a constituit, forma vegetativă să dispară, ea fiind despuiată de toate elementele care îi dădeau caracterul vieții și pe care ea le-a concentrat în spor. În cele mai multe cazuri așa se întîmplă. Forma vegetativă a bacilului cărbunelui, de exemplu, se dizolvă, se dezintegrează pe măsură ce sporul se formează. La fel se întîmplă și la alte specii. La bacilul tetanosului, forma vegetativă poate rămîne însă atașată de spor, împreună avînd aspectul caracteristic de bețe de bătut toba. Nu se poate spune dacă forma vegetativă astfel atașată păstrează, încă, caracterele vieții și dacă, desprinsă de spor, ar putea continua să trăiască și să se multiplice. Este foarte probabil că nu. Bacilii tetanosului, de altfel, sfîrșesc și ei prin a se dezintegra și în culturile vechi se găsesc aproape exclusiv numai spori.

COMPOZIȚIA CHIMICĂ A SPORULUI

Compoziția chimică a sporului nu este cunoscută în amănunt și se pare că ea diferă de a formei vegetative. Unele cercetări arată, în acest sens, că sporii sînt, în raport cu formele vegetative, mai bogați în Ca, Cu, Mn și mai săraci în P și K. Unii cercetători au găsit diferența și de ordin serologic între formele vegetative și sporii aceleiași specii, ceea ce arată că moleculele mari care compun sporul nu sînt identice cu cele care compun celula-mamă. Nențki (1884) a observat că sporii sînt mai săraci în proteine ca formele vegetative, ceea ce ar constitui una din cauzele rezistenței lor la căldură.

BIOLOGIA SPOROGENEZEI

Sporogeneza este un caracter de specie, în sensul că numai unele specii pot forma spori. Dar chiar la speciile sporogene procesul nu este uniform, fiind condiţionat de factorii interni, adică legaţi de însuşirile germenilor, şi de factorii externi, legaţi de mediul ambiant. Factorii interni au o existenţă reală. Se constată în acest sens că, în aceleaşi condiţii de mediu, unele tulpini din aceeaşi specie bacteriană sporulează mai intens, iar altele mai puţin intens sau de loc. Factorii externi influenţează, în mod net, sporogeneza (Grelet, 1951). Natura lor este variată. Vom studia pe cei mai importanţi şi-i vom împărţi, pentru uşurinţa studiului, în factori fizici, chimici şi biologici.

Factorii fizici, care pot avea o influenţă asupra procesului de sporulare, sînt: temperatura, gradul de umiditate şi potenţialul oxido-reductor al mediului.

Temperatura mediului ambiant influenţează sporogeneza, în sensul că o bacterie nu sporulează decît în anumite limite de temperatură şi chiar în cadrul acestor limite ritmul sporulării variază de la o temperatură la alta. R. Koch a studiat printre cei dintîi sporogeneza, în general, şi sporogeneza bacilului cărbunelui, în special. El a constatat că la temperaturi mai mici de 12°C bacilul cărbunelui nu sporulează, deşi formele vegetative pot încă să se multiplice. Pasteur a stabilit pe de altă parte că la temperatura de 42,5°C bacilul cărbunelui, la fel, nu sporulează deşi vegetaţia se face în condiţii aproape normale. Prima concluzie care se poate trage din aceste date este că vegetaţia, înmulţirea unei specii bacteriene, nu este legată de posibilitatea sa de a se transforma în spori ; a doua concluzie este că bacilul cărbunelui sporulează în limite de temperatură cuprinse între 12 şi 42,5°C. R. Koch a stabilit mai departe că între aceste limite de temperatură sporularea nu se face cu aceeaşi viteză. La 16°C bacilii sporulează, dar primii spori apar după o incubaţie de 7 zile. Cu cît temperatura creşte, cu atît apariţia sporilor este mai precoce. Astfel, la 21°C sporii apar după 3 zile, la 25°C după 35—40 de ore, la 30—37°C după 24 de ore.

Temperatura mediului ambiant influenţează sporogeneza şi la alte specii bacteriene. Deşi nu dispunem de cercetări precise în această privinţă, se poate spune că fiecare specie are o temperatură optimă de sporulare, precum şi temperaturi la care procesul de transformare nu se mai poate realiza.

Umiditatea mediului influenţează intensitatea sporulării. Se constată, de exemplu, că bacilul cărbunelui sporulează mai puţin intens în bulion decît pe agar şi pe un agar mai concentrat mai bine decît pe unul mai puţin concentrat, deci cu mai multă apă liberă.

Potenţialul oxido-reductor influenţează sporularea speciilor anaerobe. Bacilul tetanosului, de exemplu, sporulează după 4 ore într-un mediu cu un potenţial oxido-reductor negativ (—0,05 W) şi favorabil multiplicării şi numai după 80 de ore într-un mediu cu un potenţial oxido-reductor pozitiv (+ 0,010 W), potrivnic multiplicării.

Factorii chimici pot avea după cum vom vedea mai departe o acţiune stimulatoare sau inhibitoare asupra procesului de sporogeneză.

Glicerina inhibă sporularea bacilului cărbunelui. Eisenberg a constatat, în acest sens, că o tulpină sporogenă, întreţinută prin treceri repetate pe medii cu glicerină, se transformă într-o variantă asporogenă.

Scanned with OKEN Scanner

Ionii de calciu influenţează sporogeneza bacilului cărbunelui, aşa cum au arătat Bordet şi Renaux (1930). Autorii constată, într-adevăr, că în mediile la care se adaugă cîteva picături dintr-o soluţie 1% de Cl_2Ca, deci îmbogăţite în ionii de calciu, sporularea este slabă sau absentă, în timp ce în mediile în care ionii de calciu au fost insolubilizaţi prin adăugarea unei soluţii de oxalat neutru de sodiu (0,2%) sporularea este foarte energică. Autorii constată, mai departe, că prin cultivarea prelungită a tulpinilor sporogene pe medii oxalatate se pot obţine variante asporogene, adică sterilizabile printr-o încălzire la 60—65°C.

Fosfaţii şi sărurile de amoniu favorizează sporularea bacilului botulismului, iar unele săruri cum sînt ClNa, Cl_2Ca o împiedică.

Oxigenul influenţează într-un sens sau altul sporogeneza bacteriilor şi anume o favorizează la speciile aerobe şi o inhibă la cele anaerobe. Acţiunea favorizantă a oxigenului asupra sporulării bacililor aerobi *(Bacillus subtilis)* a putut fi bine pusă în evidenţă ; în acest scop, s-au însămînţat aceleaşi cantităţi de bacili în două volume egale de bulion care însă erau inegal aerate şi anume unul din aceste volume era etalat în strat subţire de 2—3 mm pe fundul unui vas plat, iar al doilea volum era pus într-un vas îngust în care constituia o coloană înaltă de 6 cm. S-a constatat că sporularea a fost mult mai masivă în primul vas, în care lichidul se găsea în strat subţire şi în care se putea face mai bine oxigenarea lichidului, decît în al doilea, în care oxigenarea era mai puţin intensă din cauză că lichidul forma o coloană mai înaltă şi avea o suprafaţă mai mică de contact cu aerul atmosferic. În ceea ce priveşte influenţa oxigenului asupra procesului de sporulare, mai este de amintit că bacilii cărbunelui, care nu sporulează în organismul animal şi în cadavrele animalelor cărbunoase, sporulează cu energie în sîngele virulent, îndată ce acesta vine în contact cu aerul atmosferic.

Acidul ascorbic, după cercetările făcute, printre alţii de I. Isopescu, favorizează sporularea unor tulpini de bacilii cărbunelui. Rezultate asemănătoare se obţin cu zeama de lămîie sau de roşii, produse bogate în acid ascorbic (vitamina C).

Caseina este socotită ca un factor care favorizează sporogeneza bacilului cărbunelui şi mediile de cazeină sînt folosite în vederea obţinerii unor recolte bogate de spori necesare preparării vaccinului anticărbunos.

Triptofanul, alanina, acidul glutamic, dintre aminoacizii cercetaţi, nu influenţează procesul de sporulare.

Asparagina, un alt aminoacid, este însă un inhibator al sporulării pentru *Bacillus subtilis, B. mezentericus* şi *B. megatherium.*

Factorii biologici care pot influenţa sporularea sînt multipli. Unul din ei şi pe care îl vom numi *concentraţia germenilor pe unitatea de volum* pare a fi cel mai important. Se constată, într-adevăr, că transformarea formelor vegetative în spori se face cu energie după ce numărul celulelor bacteriene în mediu a atins o anumită cifră. Această relaţie dintre concentraţie şi procesul de sporulare a fost stabilită de Zizoni şi Carlifanti (1943) pentru *Bacillus subtilis.* Cifrele obţinute sînt date în tabelul 2.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2

Relaţia dintre concentraţia germenilor şi procesul de sporulare la *Bacillus subtilis*

Ore după însămînţare	Numărul de germeni pe 1 ml	Procentul de spori
0	3 780	0,5
3	105 000	0,5
6	5 000 000	0,5
9	475 000 000	0,5
11	500 000 000	85,0

Examinînd aceste cifre, se observă că sporularea la *Bacillus subtilis* se produce în mod brusc şi procesul apare ca un salt calitativ. Într-adevăr, formele vegetative se divid un număr de generaţii (aproximativ 22, deoarece durata unei generaţii este, în medie, de 30 de minute), fără a sporula, dar acumulînd, în acest interval de timp, o serie de modificări cantitative care permit ca, de îndată ce concentraţia de germeni a atins o cifră maximă, să se producă saltul calitativ, adică transformarea formei vegetative în spori. Este foarte probabil că pe lîngă concentraţia în germeni intervin, în acest proces biologic, şi alţi factori cum sînt modificările de structură ale celulei, modificări ale mediului datorită metabolismului celulei (K o l e a k o v) etc., factori care sînt mai greu însă de precizat.

Procesul de sporulare apare, judecînd după această experienţă şi comparînd-o cu alte date, ca un terminus al unei evoluţii, ca o necesitate fiziologică. Această opinie este în contradicţie cu aceea pe care o întîlnim în unele tratate de bacteriologie şi după care sporularea se face atunci cînd forma vegetativă se găseşte în condiţii defavorabile de mediu. Acest din urmă punct de vedere este finalist şi nu pare a corespunde realităţii. Într-adevăr, şi alte fapte, în afară de cele amintite mai sus, o contrazic. P a s t e u r, de exemplu, a obţinut o atenuare a virulenţei bacilului cărbunelui cultivînd bacteria în condiţii care împiedică sporularea. Este foarte probabil că în procesul de atenuare intervine, pe lîngă alţi factori, inhibiţia sporulării, adică a unui proces fiziologic normal. În acest sens, s-a mai constatat, după cum s-a amintit mai sus, că bacilii cărbunelui, cultivaţi pe medii bogate în ioni de calciu, nu pot sporula şi, ceea ce este important, în susţinerea afirmaţiei de mai sus, este că împiedicarea sporulării este însoţită de modificări morfologice de tip degenerativ. Pe lîngă modificări morfologice, se observă şi modificări biologice. Astfel, pierderea sporogenezei prin cultivarea pe medii cu ioni de calciu este însoţită şi de pierderea patogenităţii. Citäm, în sprijinul aceleiaşi ipoteze, şi faptul observat de P r e i s z, şi anume că trecerea continuă a bacililor cărbunelui de la un animal la altul nu duce la o ridicare a virulenţei, ci dimpotrivă la scăderea ei. Ori în organism, la fel, sporularea este inhibată şi este probabil că această inhibiţie contribuie la atenuarea bacilului.

Rezultă din aceste observaţii că sporularea apare ca un fenomen încadrat în fiziologia unor specii bacteriene. Nerealizarea acestui act natural produce perturbaţii în morfologia şi fiziologia celulei.

Scanned with OKEN Scanner

VARIANTE ASPOROGENE

În cadrul speciilor sporogene pot să apară variante care au pierdut această însuşire şi care se numesc asporogene. Asemenea variante s-au obţinut, în special, din tulpini de *Bacillus anthracis*. Eisenberg (1914), de exemplu, obţine variante asporogene, cultivînd aceşti germeni pe medii cu glicerină, iar N. Stamatin (1934) în sînge defibrinat de cal.

Rezultate asemănătoare a obţinut Roux cultivînd bacilul în medii cu antiseptice, iar Bordet şi Renaux (1930) în medii bogate în ioni de calciu. Aceşti din urmă cercetători observă, în plus, că în coloniile buton apărute pe suprafaţa coloniilor primare se găsesc, la fel, germeni asporogeni. N. Stamatin (1935) plecînd de la aceste date a cercetat relaţiile dintre formarea coloniilor buton şi apariţia germenilor asporogeni şi a ajuns la rezultate asemănătoare. În coloniile buton iau naştere, pe lîngă celule sporogene, celule asporogene, care pot fi izolate prin metode obişnuite. Coloniile care conţin germeni sporogeni se recunosc macroscopic de cele formate din bacili asporogeni. Coloniile constituite de germenii din urmă sînt, în raport cu coloniile germenilor sporogeni, mai transparente; ele au o tendinţă mai netă de a-şi amplifica diametrul şi nu prezintă, pe suprafaţă, zone de liză, adică acele goluri crateriforme care se produc în masa unei colonii constituite din germeni sporogeni. Se pare că variantele asporogene, cel puţin la bacilii cărbunelui, apar ca o consecinţă a unui proces natural de evoluţie. De altfel, însăşi diversitatea şi multiplicitatea agenţilor externi, care pot produce asemenea variante, constituie o indicaţie, în sensul că aceşti factori nu au un rol decisiv în geneza variantelor asporogene. Aceşti factori inhibă însă sporularea. Împiedicînd sporularea, este foarte probabil că se produce şi o încetinire a multiplicării formelor vegetative sporogene. În aceste condiţii, în timp ce germenii sporogeni sînt inhibaţi, în evoluţia lor, prin aceea că nu pot realiza actul sporulării, germenii asporogeni se divid şi devin din ce în ce mai numeroşi în culturi. Trecerile repetate pe medii cu glicerină permit izolarea variantelor asporogene şi acestea se izolează cu atît mai sigur, cu cît numărul trecerilor este mai însemnat, ceea ce se explică prin aceea că la fiecare nouă trecere germenii asporogeni sînt avantajaţi în raport cu cei sporogeni.

FUNCŢIUNILE BIOLOGICE ALE SPORULUI

Sporul este o formă de conservare a speciei bacteriene. Capacitatea sa de conservare se datoreşte rezistenţei pe care el o are faţă de factorii chimici, fizici şi biologici, rezistenţă care depăşeşte cu mult pe a formelor vegetative din care provin. Iată care este acţiunea unor factori mai importanţi de mediu asupra sporilor, în comparaţie cu formele vegetative.

Factorii fizici. *Temperatura.* Sporii rezistă la temperatură de 60—65°C, în timp ce formele vegetative, respective, sînt distruse, în mod sigur, printr-o încălzire de 15 minute la această temperatură. Distrugerea sporilor se face la temperaturi care depăşesc cu mult 60—65°C. Astfel, sporii bacilului cărbunelui rezistă la 90°C pînă la 60 de minute, la 100°C pînă la 3—5 minute, dar la autoclav, la 120°C, ei sînt ucişi aproape instantaneu. Căldura

uscată este mai puțin activă ca cea umedă și în cuptorul „Pasteur", la 120°C, ei nu sînt omoriți decît după o încălzire de cîteva ore. La 180°C distrugerea lor este însă sigură și în scurt timp — cîteva minute.

Sporii altor specii sînt și mai rezistenți la căldură. Sporii speciei *Bacillus subtilis* nu sînt distruși la temperatura de fierbere a apei nici în cîteva ore. Sporii unor tulpini ale speciei *B. perfringens* rezistă 170 de minute la 100°C. În mod practic, sporii tuturor speciilor bacteriene patogene sînt distruși în 20—30 de minute la temperatura de 120°C, căldura umedă și o asemenea încălzire asigură, de regulă, sterilizarea bacteriologică a oricărui material. Kurzweil (1954) semnalează că în sol există spori bacterieni care rezistă pînă la cîteva ore la 120°C (autoclav). Solurile îngrășate cu bălegar conțin mai frecvent asemenea spori.

Uscăciunea nu distruge sporii decît într-un timp foarte lung. Astfel, în timp ce formele vegetative ale variantelor asporogene la bacilii cărbunelui mor pe agar într-un timp variabil, dar care nu depășește cîteva săptămîni sau luni, sporii acestor bacili pot fi conservați, pe medii uscate, timp de 10 ani sau chiar mai mult. În alte condiții, conservarea este încă și mai lungă. Astfel, sporii bacilului cărbunelui uscați și păstrați la temperatura camerei au putut fi transplantați și au dat o cultură chiar după 70 de ani. Sporii unor specii bacteriene saprofite au fost găsiți și cultivați din cutii de conserve chiar după 114 ani.

Presiunea. Sporii au o rezistență remarcabilă față de presiunea înaltă; astfel, sporii speciei *Bacillus subtilis* nu sînt distruși decît la o presiune de 20 000 atmosfere, în timp ce formele vegetative ale diverselor specii sînt, în general, distruse la o presiune de 4 000—5 000 atmosfere.

Lumina și alte diverse radiații sînt, la fel, mai active față de formele vegetative decît față de spori.

Factorii chimici. *Antisepticele* ucid sporii în concentrații mari și după un timp îndelungat de contact. Unele substanțe antiseptice sînt active față de formele vegetative, dar inactive față de spori. Astfel, glicerina, alcoolul etilic în concentrație de 30%, și clorura de sodiu în concentrație de 10—15% ucid formele vegetative, dar nu au o asemenea acțiune asupra sporilor.

Factorii biologici, cum este, în special, *antagonismul exercitat de alte microorganisme,* sînt suportați de către spori, dar nu și de către formele vegetative. Bacilul cărbunelui, de exemplu, sub forma sa vegetativă este foarte sensibil la acțiunile antagoniste exercitate de alte bacterii și, în consecință, nu se cultivă în medii în care se găsesc asemenea microorganisme. Sporii însă rezistă timp îndelungat în pămînt, fără a pierde proprietățile care le-au fost transmise de forma vegetativă, deși în pămînt există o floră foarte bogată și variată.

GERMINAȚIA SPORULUI

Sporul, pus în condiții favorabile, în special de umiditate și temperatură, dă naștere la o formă vegetativă. Procesul poartă numele de germinația sporului. El este precedat de o absorbție de apă, de o tumefiere a

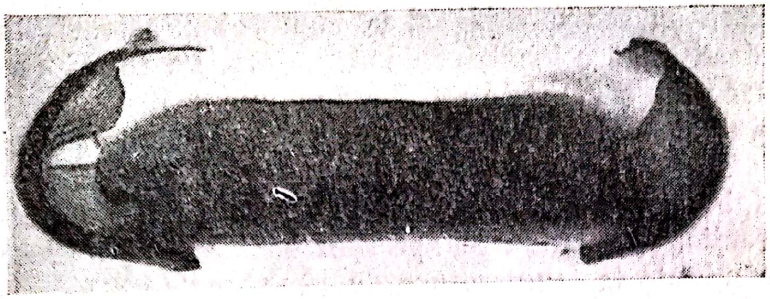


Fig. 6 — Germinarea sporului. Imagine electronică (după **Knaysi** și col.)

La capetele bacilului se observă membrana sporului

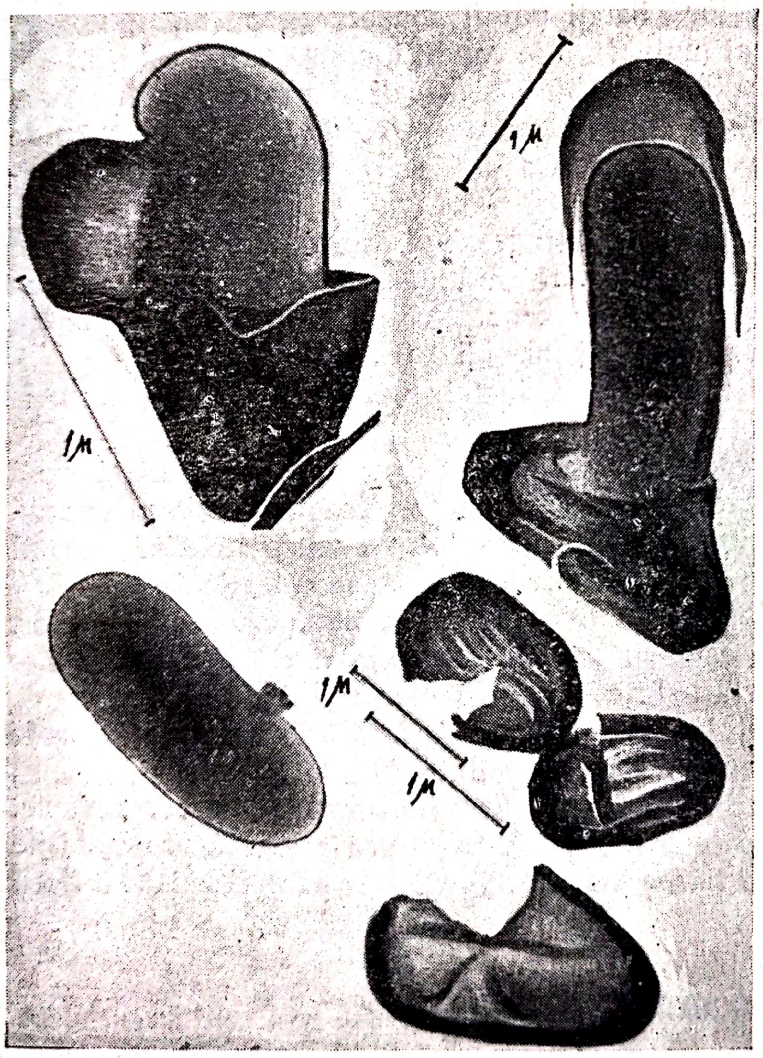


Fig. 7 — Diverse faze în germinarea sporului (după **Knaysi** și col.)

membranei și de o pierdere a refringenței. O dată această fază pregătitoare realizată, printr-unul din poli sau prin zona ecuatorială, herniază forma vegetativă, care lasă în urmă membrana sporului. Aceasta este vizibilă și apare ca o umbră în cîmpul microscopic. Viteza de germinație este în funcție de o serie de factori și, în primul rînd, de temperatura și de vechimea sporului. Astfel la temperatura de 37°C sporii bacilului cărbunelui, recent formați, germinează între 60 și 90 de secunde, dar, în aceleași condiții, sporii vechi germinează în 27 de ore. Temperaturile optime de germinare, precum și limitele de temperatură în care procesul are loc nu sînt cunoscute. Unii cercetători afirmă că sporii bacilului cărbunelui germinează chiar și la 0°C.

CONSTITUENȚII MORFOLOGICI AI CELULEI BACTERIENE

Celula bacteriană este constituită dintr-o membrană numită ectoplasmă și un conținut, numit endoplasmă.

MEMBRANA

Membrana sau ectoplasma constituie în-

Scanned with OKEN Scanner

velişul sau stratul extern al celulei bacteriene. Grosimea membranei celulare variază de la o specie la alta şi, în cadrul aceleiaşi specii, de la o celulă la alta.

Bacillus cereus, de exemplu, măsoară 1—2 μ lăţime şi 3—5 μ lungime şi are o membrană a cărei grosime variază de la 0,25 la 0,35 μ.

COLORAŢIA MEMBRANEI

Examenul direct, precum şi metodele obişnuite de colorare nu pot pune în evidenţă membrana, care însă se colorează prin procedee speciale. Eozinatul de albastru de metilen, de exemplu, o colorează diferit de endoplasmă şi anume în albastru-palid, portocaliu, roz sau roşu. Membrana se colorează şi cu coloranţi din seria sudanului, ceea ce pare a arăta natura ei lipidică.

COMPOZIŢIA CHIMICĂ A MEMBRANEI

Compoziţia chimică a membranei variază de la o specie la alta. Principalii săi componenţi chimici sînt de natură protidică şi cepridică. Complecşii glucido-lipido-polipeptidici, care se izolează de la bacteriile Gram negative, par a fi situaţi tot în membrana bacteriană. Moleculele componente ale membranei au o însemnată stabilitate chimică.

FUNCŢIUNILE BIOLOGICE ALE MEMBRANEI

Membrana celulelor bacteriene este o realitate morfologică şi nu o ficţiune, aşa cum afirmă unii cercetători. Există numeroase dovezi care atestă prezenţa ei în jurul celulei. Astfel, unii autori, punînd bacterii în soluţii hipertonice, 1% clorură de sodiu, sau 2,5% hidrat de potasiu, observă detaşarea membranei de endoplasmă. Celula, în aceste condiţii, pierde apa de constituţie şi, în consecinţă, membrana se ratatinează, se încreţeşte, dovedindu-şi, prin aceasta, prezenţa, căci dacă ea nu ar exista ca unitate morfologică fenomenul de încreţire nu ar fi posibil. Ruska, folosind microscopul electronic, observă, în acelaş sens, că la unele celule, în anumite faze ale evoluţiei lor, se produce de asemenea o încreţire a învelişului extern. La celulele tinere membrana este în contact intim cu endoplasma, bacteriană, dar, la formele celulare bătrîne, membrana

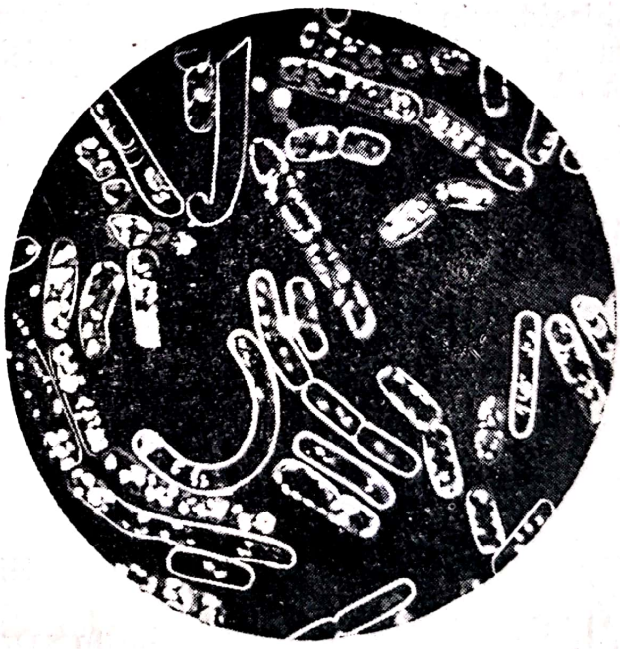


Fig. 8 — Membrana bacteriană la *Bacillus megatherium* (după **Topley şi Wilson**)
Examen în cîmp întunecat. Fotografie în lumină ultravioletă (x 2 500)

Scanned with OKEN Scanner

se dezlipeşte de endoplasmă creîndu-se, astfel, un spaţiu între membrană şi conţinut, cele două elemente celulare. Mai departe, folosindu-se micromanipulatorul, bacteriile au putut fi disecate la microscop, aducîndu-se astfel o dovadă directă în sprijinul existenţei membranei. Se observă, într-adevăr, că atunci cînd se secţionează în două o bacterie, citoplasma se scurge şi iese din membrană. În plus, s-a constatat că membrana este mai rezistentă ca endoplasma, faţă de procesul de autoliză, ceea ce a permis izolarea şi identificarea produşilor chimici care o compun şi care sînt diferiţi de cei ce se găsesc în endoplasmă. S-a adus astfel, în sprijinul existenţei membranei, un argument de natură chimică.

Viaţa celulară nu se poate menţine decît într-un anumit cadru fizico-chimic, adică la o anumită concentraţie de săruri şi ioni de hidrogen şi în prezenţa unor complexe chimice de o structură caracteristică celulelor fiecărei specii. Acest cadru nu poate exista şi nu se poate menţine decît separînd celula de mediul ambiant. Această separare este realizată de membrana celulară, care are funcţiunile unui filtru; ea împiedică pătrunderea în celulă a unor complexe chimice cu moleculă mare, dar, în acelaşi timp, opreşte solubilizarea componenţilor săi celulari în mediu. Membrana celulei bacteriene poate fi comparată, în anumite privinţe, cu peretele tubului gastrointestinal al animalelor superioare.

Prezenţa membranei permite existenţa, în endoplasma celulelor, a unor produşi hidrosolubili, deoarece membrana izolează celula de mediul hidric în care viaţa celulei evoluează. Funcţiunile izolatoare au putut fi bine puse în evidenţă, în condiţii experimentale. Celulele speciei *Escherichia coli*, de exemplu, au la suprafaţă o membrană constituită din complecşi insolubili în apă, iar în soma celulei se găseşte, printre alţi compuşi, o nucleoproteidă toxică. Acest din urmă complex este solubil în apa alcalinizată (pH—8,2), dar el nu trece în soluţie decît în cazul cînd membrana celulei a fost solubilizată prin tratarea cu acid tricloracetic. Suspensiile celulare, netratate cu acid tricloracetic şi în care celulele îşi păstrează învelişul extern, nu pun în libertate complexul nucleoproteidic. Deci, dacă celulele nu ar avea o membrană, componenţii săi esenţiali, cum sînt complecşii nucleoproteidici, s-ar solubiliza şi viaţa celulei nu ar fi posibilă.

În concluzie, celulele bacteriene au la exterior o membrană, a cărei prezenţă poate fi dovedită morfologic, chimic şi biologic. Membrana separă celulele de mediul ambiant, permiţînd astfel, în interiorul celulei, atît dezvoltarea proceselor chimice caracteristice fiecărei specii, cît şi prezenţa unor complecşi chimici hidrosolubili esenţiali pentru viaţa celulei. Membrana bacteriană nu trebuie însă înţeleasă ca un filtru mecanic, ci ca unul biologic. Permeabilitatea membranei variază, în consecinţă, în raport cu starea fiziologică a celulei. Aceste variaţii permit, de exemplu, celulei să elimine, în mediul ambiant, molecule de dimensiuni mari, cum sînt exofermenţii.

CAPSULA

Capsula este constituită dintr-o secreţie celulară care, fixîndu-se la exteriorul celulei secretoare, formează un înveliş, o teacă. Ea are, pentru unele specii, relaţii strînse cu patogenitatea. Capsula adevărată este uşor colorabilă şi se întîlneşte la unii germeni patogeni, dintre care cei mai importanţi sînt: pneumococul, streptococul (unele specii), pneumobacilul (*Klebsiella*

Scanned with OKEN Scanner

pneumoniae), Bacillus anthracis. Unele specii de ciuperci *(Torulopsis neoformans,* de exemplu) sînt, la fel, capsulate.

CARACTERE MORFOLOGICE

Capsula, la unii germeni — *Bacillus anthracis, Diplococcus pneumoniae* — apare ca o formaţie suficient de consistentă. Iniţial însă ea se prezintă, la *Bacillus anthracis,* ca un mucus difluent, deformabil, de elementele figurate care se găsesc, eventual, în amestec. În preparatele cu tuş unii cercetători observă uşoare vibraţii ale membranei capsulare externe, ceea ce, la fel, denotă consistenţa gelatinoasă a acestei formaţii. Se constată însă că pe măsură ce ne îndepărtăm de momentul de formare a capsulei, consistenţa ei creşte, pentru a îmbrăca, în cele din urmă, mai ales la *B. anthracis,* o formă perfect geometrică, mărginită de linii şi unghiuri drepte.

Dimensiunile capsulei, în raport cu corpul bacterian pe care îl îmbracă, variază în limite destul de largi. Uneori, şi la unele specii, ea este foarte subţire; alteori ea depăşeşte diametrul transversal al celulei. Secreţia materiei capsulare este la unele specii (pneumobacilul lui Friedländer şi variantele mucogene ale speciei *Bacillus anthracis)* foarte abundentă şi se traduce prin formarea, pe suprafaţa mediilor solide, a unor colonii mucoase, difluente. Mediile lichide, în care s-au dezvoltat asemenea germeni, capătă o consistenţă sirupoasă. Trebuie să se adauge însă că nu orice colonie mucoasă conţine bacili capsulaţi. Mucusul nu îmbracă la toate speciile această formă de înveliş bacterian, nu se fixează în jurul celulei, ci el se poate răspîndi în mod uniform în colonie, dîndu-i aspectul mucos. Capsula adevărată se poate distinge de secreţia mucoasă prin următorul procedeu de colorare: frotiul uscat este fixat 10 minute în lichidul lui Chabaud (alcool de 80°, 50 ml, formol din comerţ 5 ml, acid acetic glacial 2 ml şi fenol 15 g), apoi se spală şi se tratează 30 de minute cu o soluţie 5% de acid tanic; se spală din nou şi se colorează una sau mai multe ore cu o soluţie apoasă de cristal violet 1/10 000. Capsula se prezintă, în aceste preparate, ca un înveliş bine definit, cu o membrană externă, în timp ce învelişul mucos este amorf, lipsit de formă şi structură. Unii germeni capsulaţi *(B. anthracis)* pot secreta mai multă substanţă decît au nevoie pentru a construi învelişul capsular şi, în acest caz, substanţa capsulară se răspîndeşte printre germenii care compun colonia. Într-un frotiu, făcut dintr-o asemenea colonie, se găsesc bacili capsulaţi, precum şi insule de substanţă capsulară, colorate la fel ca şi capsula.

CONDIŢIILE DE FORMARE A CAPSULEI

Unii germeni sînt necapsulaţi pe mediile de cultură, dar ei se înconjoară de acest înveliş scurt timp după introducerea lor într-un organism sensibil faţă de acţiunea lor patogenă sau după însămînţarea lor pe medii care favorizează dezvoltarea acestei formaţii. J. Bordet, de exemplu, inoculînd la iepuri streptococi virulenţi şi necapsulaţi, îi găseşte capsulaţi la 10 minute după introducerea lor în cavitatea peritoneală. D. Combiescu (1929) observă încapsularea bacilului cărbunelui virulent la 5—10 minute după însămînţarea în sînge citratat sau defibrinat, sau în ser inactivăt de cal, iepure, oaie sau om. În organismul animal, bacilii cărbunelui se capsulează în 5—10 minute.

Umorile organice exercită deci o acţiune capsulogenetică, atît in vivo cît şi in vitro. *Bacillus anthracis* virulent, care este necapsulat pe mediile obişnuite, se încapsulează scurt timp după venirea sa în contact cu diversele lichide organice — lichid ascitic, ser sanguin, sînge etc. Această constatare ne arată că în aceste lichide există substanţe de natură chimică încă neprecizată, care stimulează capsulogeneza.

Concentraţia în care aceste lichide îşi exercită acţiunea capsulogenetică este foarte variabilă. *B. anthracis* se încapsulează atît în sînge defibrinat de cal, oaie, bou, cît şi pe un agar care conţine 5—10% sînge sau ser. Serul inactivat pare mai favorabil capsulării decît sîngele proaspăt. Zotov (1938) obţine încapsularea bacilului cărbunelui pe ser de oaie, iepure sau cal, coagulat la 80°C şi căruia i s-a adăugat, înainte de coagulare, 0,75% naganin. Rezultate similare obţine M. Sterne (1937) pe un agar cu 10% ser sanguin şi incubat într-o atmosferă care conţine 25% CO_2. Este demn de observat că bioxidul de carbon, chiar în absenţa unor lichide de origine animală, are o acţiune capsulogenetică şi bacilii cărbunelui virulenţi, cultivaţi într-o atmosferă bogată în acest gaz, dau colonii mucoase.

Bacilii cărbunelui virulenţi sînt capsulaţi în organismul animalelor receptive sau pe medii potrivite, dar ei pierd acest înveliş de îndată ce sînt trecuţi pe medii obişnuite. Capsularea apare astfel ca un fenomen trecător, legat de existenţa unor condiţii speciale de mediu. Acest lucru este adevărat atît timp cît cultivarea, în asemenea condiţii, este limitată în timp. Prelungind însă cultivarea, se constată că unii bacili se transformă şi îşi menţin însuşirea de a capsula chiar şi pe medii obişnuite: agar, în special pe agarul alcalin, pH=7,6—8. Se obţin astfel variante mucogene, denumite Sm, şi avînd un grad însemnat de stabilitate. Fixarea acestui caracter a fost realizată de N. Stamatin prin treceri repetate şi cultivări prelungite în sînge defibrinat de cal. O asemenea tulpină îşi păstrează caracterul mucogen după o conservare de aproape 20 de ani pe medii obişnuite.

Tulpinile mucogene au o virulenţă redusă, ceea ce înseamnă că învelişul capsular diminuează unele funcţiuni biologice ale germenului, tulbură exercitarea unor prerogative ale bacteridiei. Acest fapt a făcut pe unii autori să considere formarea capsulei ca o tulburare metabolică, ca o „boală“ a bacteridiei.

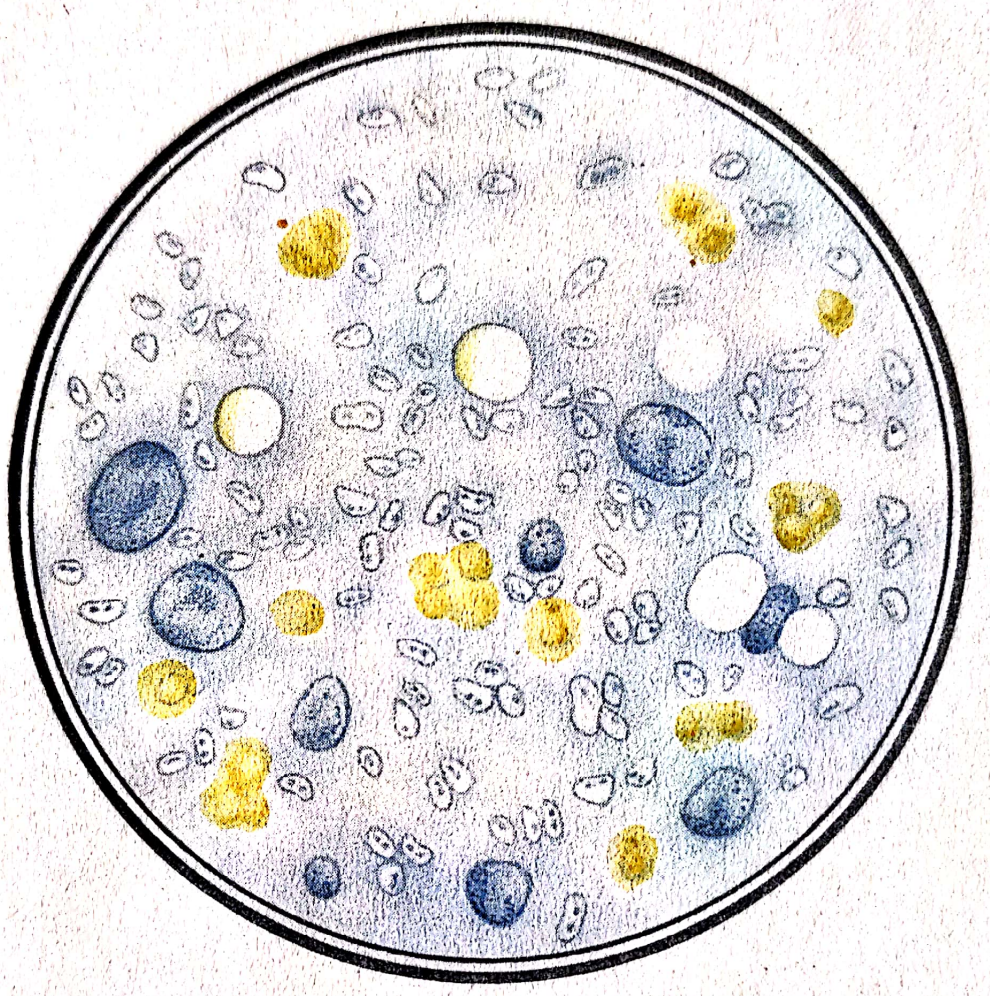
Formarea capsulei apare deci ca un fenomen de adaptare la noi condiţii de mediu, ca rezultatul acţiunii antagoniste dintre microb şi gazdă. Obţinerea unor variante care capsulează pe mediile obişnuite dovedeşte încă o dată influenţa suverană a mediului asupra vieţuitoarelor. Sub influenţa mediului apar însuşiri noi, cu caracter ereditar.

COMPOZIŢIA CHIMICĂ A CAPSULEI

Cercetările chimice şi serologice au arătat că substanţele chimice care compun capsula diferă de cele ale corpului bacterian. Componenţii capsulei au putut fi identificaţi chimic la unele specii. Astfel, capsula pneumococului este constituită dintr-un polizaharid, a bacilului cărbunelui dintr-un polipeptid — un polimer al acidului glutamic dextrogir — a ciupercii *Torulopsis neoformans* din xiloză şi manoză, plus cantităţi mici de acid uronic legat de manoză etc. Aceste substanţe nu se pot extrage decît din germenii capsulaţi şi lipsa lor la formele acapsulate dovedeşte că ele sînt componente

Scanned with OKEN Scanner

PLANȘA I



Germeni capsulați de *Diplococcus pneumoniae*
Frotiu din organe de cobai

Scanned with OKEN Scanner

Germeni capsulați și capsule goale de *Bacillus anthracis*

Frotiu din organe de porc mort de antrax.
Colorație Giemsa

Scanned with OKEN Scanner

Proteus vulgaris ciliat
Coloraţie Casares-Gill

Scanned with OKEN Scanner

capsulare, dar nu exclude prezența, în capsulă, a unor fracțiuni care se găsesc și în corpul bacterian. Este de observat, în această privință că deși capsula pneumococului diferă chimic de a bacilului cărbunelui, capsulele celor două specii se colorează la fel, prind aceeași nuanță, prin soluția Giemsa.

FUNCȚIUNILE BIOLOGICE ALE CAPSULEI

Rolul defensiv al capsulei este demonstrat. Prezența capsulei împiedică, de exemplu, fagocitoza. Acțiunea antifagocitară se realizează fie direct (bacilul cărbunelui capsulat nu aderă la protoplasma leucocitară), fie prin substanțele antifagocitare pe care le conține (pneumococul).

Datorită acestor proprietăți capsula are, pentru unele specii, legături strînse cu virulența. Astfel, numai pneumococii capsulați sînt virulenți, în timp ce cei lipsiți de patogenitate sînt fără capsulă. *Bacillus anthracis* este necapsulat pe mediile obișnuite de cultură, dar, dacă este virulent, el se înconjoară de o capsulă scurt timp după pătrunderea sa în organismul sensibil sau după însămînțarea sa într-un mediu care conține lichide de origine animală. Bacilii nepatogeni nu pot capsula nici în organismul animal, nici pe medii convenabile.

În general, o serie întreagă de bacterii patogene ca salmonele, colibacili, streptococi, stafilococi etc. suferă în organism modificări de formă, care se traduc printr-o mărire a diametrului transversal și care sînt o consecință a hipertrofiei membranei microbiene. La unele specii, această hipertrofiere este ușor de pus în evidență, prin metode speciale de colorație, capsula colorîndu-se diferit de corpul bacterian. La alte specii, însă, nu se pot pune ușor în evidență diferențe de colorabilitate între membrană și corpul bacterian și de aceea hipertrofia membranei este mai greu de sezisat.

În concluzie, capsula este un organit caracteristic unor specii bacteriene și ea are funcțiuni importante în viața celulei.

CILII SAU FLAGELII

Cilii sau flagelii sînt formații filamentoase ondulate, lungi și subțiri, care constituie pentru bacterii organitele de mișcare.

CARACTERE MORFOLOGICE

Cilii sau flagelii se întîlnesc la un număr important de specii, coci sau bacili. Numărul și poziția lor sînt constante pentru aceeași specie, de aici importanța cililor în identificarea speciilor. Astfel, sînt specii care au un singur ci situat polar — monotricha — altele au doi cili situați cîte unul la cei doi poli — amphitricha — altele un smoc de cili la fiecare din cei doi poli — lophotricha — și în fine o a treia categorie de germeni au mai mulți cili situați de jur împrejurul celulei — peritricha. Speciile lipsite de cili se mai numesc și atricha sau aciliate.

Cilii sînt subțiri; ei au în toată lungimea lor aceeași grosime; de obicei sînt ondulați. Lungimea lor depășește cu mult diametrul longitudinal al celei; ei pot atinge, la unele specii, o lungime de 30 μ.

Scanned with OKEN Scanner

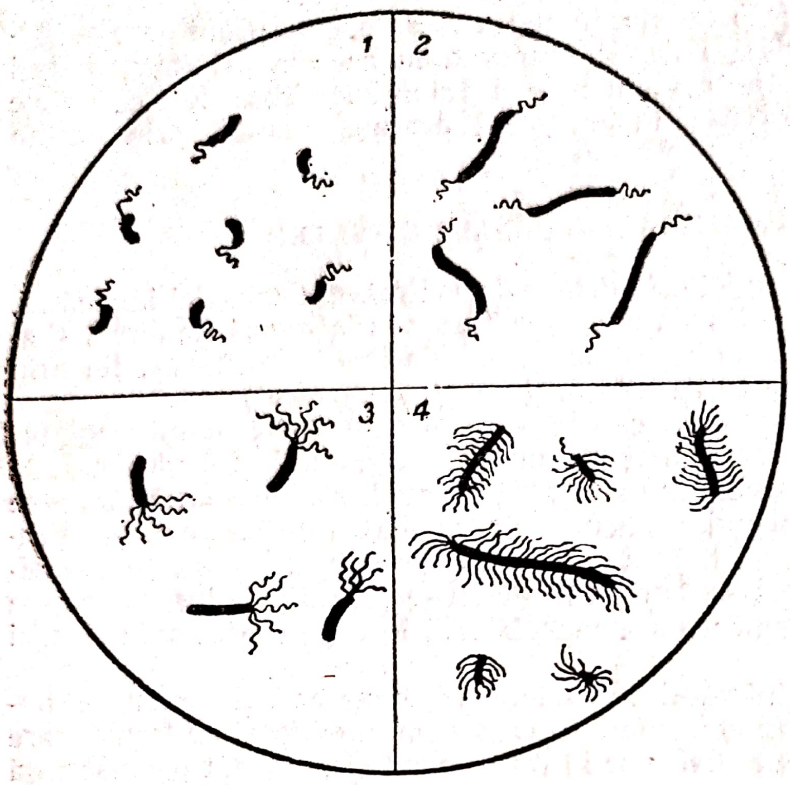


Fig. 9 — Poziția și numărul cililor la bacterii
1 — monotricha; 2 — amphitricha; 3 — lophotricha; 4—peritricha

METODE DE PUNERE IN EVIDENȚĂ

Cilii bacterieni pot fi puși în evidență prin metode indirecte (examinarea mobilității în picătură suspendată, însămînțarea pe medii semilichide) sau metode directe — vizionarea cililor după colorare. Examinarea bacteriilor în cîmp microscopic luminat direct (picătură suspendată sau între lamă și lamelă) permite să se observe mobilitatea celulelor bacteriene, fără însă a vedea organitele care imprimă această mobilitate. Vederea directă a cililor se poate face însă în cîmp întunecat, precum și cu ajutorul microscopului electronic.

Cilii nu se văd în frotiurile colorate prin metodele curente de laborator: Gram, Giemsa, albastru de metilen etc. Pentru a-i putea colora este necesar să se recurgă la metode speciale de mordansare și colorare. S-au descris numeroase asemenea metode și ele dau rezultate cînd sînt corect aplicate.

FUNCȚIUNI BIOLOGICE

Mobilitatea pe care cilii o imprimă celulei este importantă. Ei pot face ca celula bacteriană să traverseze într-o secundă o distanță de 10 sau 12 ori mai mare ca diametrul ei longitudinal. Asemenea viteze nu întîlnim la animalele superioare. Astfel, calul Pur sînge de galop poate parcurge 1 km în 1′ și 13″, el făcînd într-o secundă o distanță de aproximativ 8 ori lungimea sa corporală (1,56 m). Omul poate face 100 m în 10,2′ ceea ce, la fel, nu depășește lungimea sa corporală decît de cîteva ori.

S-a măsurat, pentru cîteva specii bacteriene, viteza de deplasare a celulei pe secundă, la temperatura camerei și cifrele obținute sînt următoarele:

Vibrio cholerae	0,030 mm
Salmonella typhosa	0,12 mm
Bacillus subtilis	0,010 mm
Bacillus megatherium	0,008 mm

Scanned with OKEN Scanner

După Knaysi (1938) aceste cifre pot fi depăşite, unele bacterii putînd traversa 0,2 mm într-o secundă.

Rolul cililor în mişcarea bacteriilor a fost contestat de Pijper (1946), care afirmă că bacteriile mobile îşi datoresc mobilitatea mişcărilor giratorii şi ondulatorii ale corpului bacterian însuşi, mişcări care ar fi rezultatul contractibilităţii protoplasmei. Flagelii sau cilii sînt antrenaţi în mişcarea celulei şi formează o coadă a acesteia, fără însă a contribui la propulsia ei. Autorul îşi sprijină afirmaţiile sale pe observaţii făcute la microscop pe fond întunecat şi pe faptul că celulele, aparţinînd speciilor mobile, nu-şi pierd mobilitatea chiar dacă cilii au fost desprinşi printr-o agitaţie puternică, într-un aparat vibrator. Opinia lui Pijper, care contrazice concepţia clasică, nu a fost confirmată şi de alţi cercetători. Kauffmann, Boltjes, Sturdza (1951) o socotesc, dimpotrivă, nefondată. Sturdza a făcut un studiu larg asupra mobilităţii la *Proteus* şi, folosind tehnici noi, a ajuns la concluzia că mobilitatea se datoreşte activităţii cililor, care execută mişcări elicoidale prin contracţiile lor ritmice. Cilii imprimă atît mişcarea lulei, cît şi direcţia acestei mişcări.

CONDIŢIILE MOBILITĂŢII

Bacteriile prezintă mişcările cele mai vii în condiţiile dezvoltării optime şi, în consecinţă, examenul mobilităţii trebuie să se facă în condiţii cît mai apropiate de acest optim. Germenii care au optimul de dezvoltare la 37°C trebuie examinaţi, pe cît posibil, la această temperatură. Anaerobii, pentru care oxigenul este un gaz toxic, trebuie examinaţi în absenţa acestui gaz, iar aerobii, dimpotrivă, în prezenţa lui. Depărtarea, într-un sens sau altul, de condiţiile optime de creştere, alterează mobilitatea celulară. Temperaturile prea scăzute ca şi cele prea ridicate inhibă mobilitatea. Astfel tulpinile de *Escherichia coli* sau *Bacillus subtilis*, cultivate la 47°C, sînt imobile, dar ele devin mobile cînd sînt trecute la temperatura de 35°C. *Pasteurella pseudoturberculosis* se dezvoltă şi la 37°C şi la temperatura camerei, dar numai germenii cultivaţi la temperatura camerei sînt mobili. La fel, se pare că se comportă şi *Listerella monocytogenes*. Substanţele toxice pentru celula bacteriană alterează, trecător sau definitiv, organitele mobilităţii. Fenolul, în concentraţie de 0,1%, produce liza cililor; prin cultivarea speciei *Proteus* X_{19} în medii fenolate, s-au obţinut variante care au pierdut definitiv aparatul ciliar

Fig. 10 — Cilii la *Bacillus cochearius* (după **Levenson**)
Cultură de 15 ore. Coloraţie Casares-Gil. (x 1800)

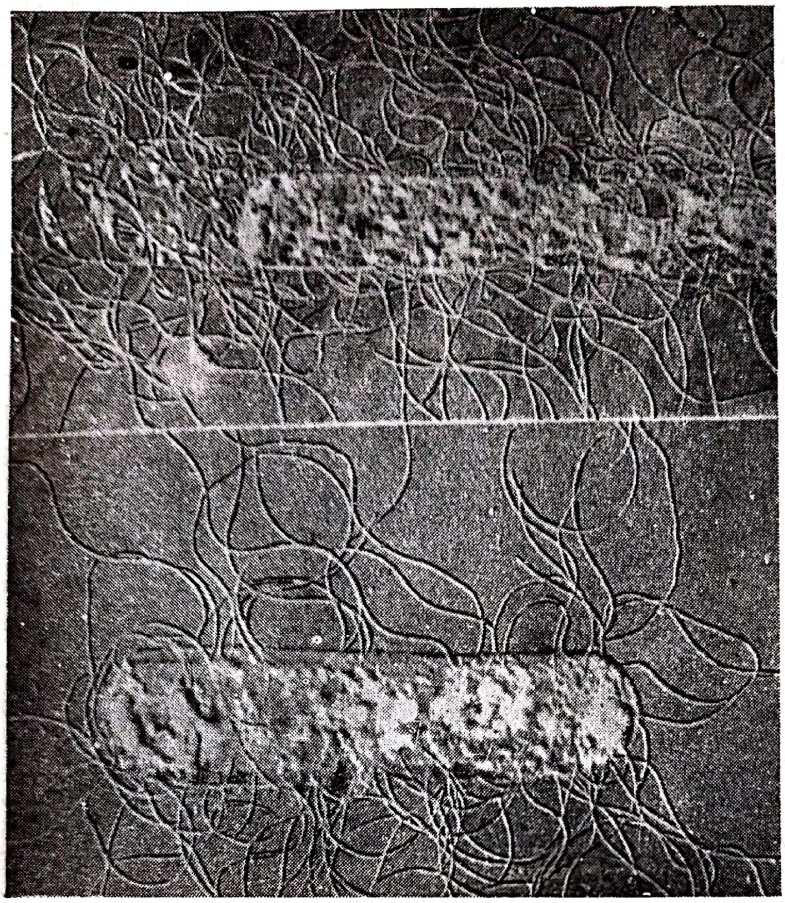


Fig. 11 — Cilii la *Proteus vulgaris*. Imagine electronică (după **Iterson** și **Robinow**)
Cilii par a-și avea originea într-o granulă situată sub membrana bacteriană

și deci mobilitatea ; același rezultat se obține și prin cultivarea la 42°C. Soluțiile saline hipertonice inhibă mobilitatea bacteriilor. Serurile aglutinante paralizează de asemenea activitatea cililor. Sulfatiazolul, adăugat agarului în proporție de 0,002 %, împiedică mobilitatea la *Proteus* și difuziunea sa pe suprafața mediului.

Germenii culturilor tinere sînt mai mobili ca cei din culturile vechi. Bacilii aerobi devin imobili în momentul transformării lor în spori, dar cei anaerobi își conservă mobilitatea chiar după construirea suportului.

Mișcarea activă datorită prezenței cililor trebuie diferențiată de mișcarea pasivă moleculară. Aceasta din urmă este rezultatul acțiunii energiei cinetice și moleculare din mediul ambiant și, în consecință, se observă și la particulele inanimate de dimensiuni reduse și anume mai mici de 4 μ. Această mișcare nu provoacă o deplasare a celulei, ci un joc, o tremurare continuă și pe loc. Diferențierea precisă și rapidă între cele două feluri de mișcări se poate face adăugînd, picăturii suspendate puțină soluție antiseptică ; aceasta va omorî celulele, va paraliza cilii și deci mișcarea activă, dar nu va influența mișcarea pasivă.

COMPOZIȚIA CHIMICA

Compoziția chimică a cililor unor specii a putut fi, într-o oarecare măsură, precizată. Astfel, s-a găsit că cilii speciei *Proteus* X_{19} sînt de natură proteică. În mediu acid (pH=3), ei se descompun în particule uniforme, ușor alungite, cu o greutate moleculară de 40 000. Aceste particule se văd cu microscopul electronic și sînt de natură proteică. În cili, particulele se dispun liniar, fiind învelite și legate între ele printr-o substanță polihidroxilică. Cilii conțin 15—16 % azot, urme de fosfor și numai 1 % glucide. Nu conțin triptofan și nici baze purinice sau pirimidinice. Tirozina se găsește

în proporţie de 1,8—1,9% în cilii salmonelelor. Cilii speciei *Bacillus subtilis* au o constituţie similară şi se descompun, la fel, în mediu acid, în particule uniforme, care conţin azot, dar nu conţin nici fosfor, nici acizi nucleici. Ele sînt constituite exclusiv din aminoacizi. Unii aminoacizi cum sînt triptofanul, histidina, cistina, cisteina şi hydroxiprolina sînt absenţi, dar ceilalţi aminoacizi cunoscuţi sînt prezenţi.

Componenţii chimici ai cililor diferă de cei ai corpului bacterian şi de aici diferenţa antigenică dintre somă şi cili.

ENDOPLASMA

RELAŢIILE DINTRE NUCLEU ŞI CITOPLASMA

Endoplasma sau conţinutul celulei bacteriene are o structură caracteristică, care se deosebeşte de a altor vieţuitoare monocelulare prin aceea că în ea, prin metodele obişnuite de colorare, nu se poate pune în evidenţă un nucleu distinct de protoplasmă.

Pentru a explica această particularitate s-au formulat mai multe ipoteze.

O primă ipoteză admite că bacteriile sînt celule lipsite de nucleu. Cercetătorii care au emis această ipoteză se bazau, în primul rînd, pe constatarea că bacteriile dau reacţia Feulgen negativă. Diversele granulaţii cromatice sau metacromatice care se găsesc în celulele bacteriene erau considerate, de aceşti autori, drept rezerve alimentare. Ipoteza absenţei nucleului la celulele bacteriene a fost respinsă de cei mai mulţi cercetători. Într-adevăr, biologic, este greu să se admită absenţa totală a acestei formaţii aşa de caracteristice tuturor celulelor vegetale sau animale. De altfel, cercetările făcute au confirmat acest punct de vedere logic. Numeroşi autori au pus în evidenţă, în corpul celulelor bacteriene, mai ales la unele specii de mixobacterii (Imşeneţki), granulaţii care tinctorial, morfologic şi chimic, trebuie considerate ca formaţii nucleare, asemănătoare cu cele ce se găsesc în nucleul celulelor cu organizaţie superioară. Examenele morfologice făcute au arătat că aceste granulaţii iau parte la procesul de diviziune celulară, că diviziunea citoplasmei este precedată de o diviziune a nucleului. In plus, în ultimul timp, analizele chimice au arătat că toate bacteriile, indiferent dacă microscopic au sau nu o formaţie nucleară distinctă, conţin acid dezoxiribonucleic, constituentul principal al nucleului.

Aceste date arată că celula bacteriană posedă o materie nucleară, dar asupra structurii şi poziţiei sale în celulă s-au ivit divergenţe între cercetători, ceea ce a dus la formularea a încă două ipoteze. Una admite existenţa unui nucleu difuz, răspîndit în masa protoplasmatică, iar alta, dimpotrivă, susţine prezenţa unui nucleu individualizat, reprezentat prin una sau mai multe granulaţii cromatice.

Ipoteza necleului difuz a fost emisă şi susţinută de Bütschli, Schaudinn, Guilliermond, iar recent (1940—1946) de Imşeneţki. Bacteriile, conform acestei concepţii, au o structură similară cu aceea descrisă la *Cyanophiceae*, plante monocelulare şi pigmentate din grupul algelor. Protoplasma, atît la bacterii cît şi la *Cyanophiceae*, ar avea o structură alveolară şi ar prezenta două straturi: unul cortical, foarte subţire şi pur protoplasmatic, altul central, cu structură alveolară şi

care conţine, în ochiurile alveolelor, corpusculi cromatici. Stratul cortical se colorează slab, în timp ce corpul central, datorită prezenţei corpusculilor cromatici, se colorează intens. Acest corp central ar ocupa, la bacteriile de talie mică, întreaga celulă, ceea ce a făcut pe unii cercetători (Zettnow) să admită că celula bacteriană este un simplu nucleu, lipsit de citoplasmă.

Ipoteza care admite existenţa la bacterii a unui nucleu distinct de protoplasmă, asemănător celui întîlnit la celulele vegetale sau animale a fost emisă de Meyer (1897) şi ea a găsit, în ultimul timp, numeroşi adepţi cum este, printre alţii, Peşkov (1937). Ipoteza se sprijină pe numeroase date experimentale şi fapte de observaţie. Folosirea unor metode elective de coloraţie a pus, într-adevăr, în evidenţă, la numeroase specii bacteriene, prezenţa unor formaţii granulare care, prin poziţia lor în celulă, prin funcţiunile şi compoziţia lor chimică, par a fi înseşi nucleii celulari. Astfel, în preparatele bacteriene, fixate cu formol şi colorate cu fuxină, se găsesc celule cu una sau mai multe granule cromatice. Celulele tinere pot conţine o singură granulă, iar cele bătrîne 4—6. Rezultate similare a obţinut Valentina Roşca (1937) prin întrebuinţarea metodelor speciale de coloraţie recomandate de Hollande. Autoarea, spre deosebire însă de alţi cercetători, constată că celulele tinere conţin mai multe granulaţii cromatice decît cele bătrîne.

Folosirea metodelor chimice şi biologice a dus la rezultate asemănătoare. Bacteriile, ca şi celelalte celule animale sau vegetale, par a avea un nucleu distinct de citoplasmă care, la unele specii, cum este, de exemplu, *Spherophorus funduliformis,* poate fi pus în evidenţă prin metode obişnuite de coloraţie — coloraţie cu soluţie Giemsa. La majoritatea speciilor bacteriene însă nucleul nu se colorează distinct de citoplasmă pentru motivul că ambele componente celulare au aceeaşi afinitate pentru coloranţii bazici, au aceeaşi bazofilie. Înlăturîndu-se însă bazofilia citoplasmatică, la bacteriile care prezintă acest caracter, nucleul apare ca o formaţie centrală caracteristică. Bazofilia citoplasmatică a putut fi înlăturată prin diverse metode, dar folosirea enzimelor specifice a dat, se pare, cele mai concludente rezultate.

Cum s-a ajuns la folosirea enzimelor specifice?

Celula bacteriană conţine, ca toate celulele cunoscute şi cercetate, doi acizi nucleici şi anume: acidul ribonucleic sau zimonucleic şi acidul dezoxiribonucleic sau timonucleic. În celulele animale şi vegetale cu nucleul distinct, cei doi acizi nu sînt amestecaţi, ci unul din ei şi anume acidul ribonucleic se găseşte în citoplasmă, iar al doilea şi anume acidul dezoxiribonucleic se găseşte în nucleu. Această repartiţie a celor din acizi nucleici a fost pusă în evidenţă şi la bacterii, folosind tocmai acţiunea enzimelor specifice. Într-adevăr, bacteriile, fixate, în prealabil, cu un fixator histologic şi apoi tratate cu ribonuclează (ferment extras din pancreasul de bou şi activ numai faţă de acidul ribonucleic) prezintă, în preparatele colorate cu soluţie Giemsa, o formaţie centrală intens colorată şi o zonă periferică colorată palid. Partea periferică a celulei corespunde zonei celulare în care se găseşte în mod obişnuit, acidul ribonucleic. Dezintegrarea acestuia din urmă de către ribonuclează face ca afinitatea zonei respective pentru coloranţii bazici să se reducă. Dimpotrivă, formaţia centrală corespunde zonei în care se găseşte acidul dezoxiribonucleic, care nu a fost descompus de ribonuclează şi

Scanned with OKEN Scanner

care deci își conservă afinitățile tinctoriale normale. Această din urmă formație, prin sediul ei central, precum și prin aceea că ea conține acidul dezoxiribonucleic întîlnit în nucleul tuturor celulelor, trebuie considerată ca nucleul bacterian. Se observă, în același timp, că formația centrală este dublă la celulele bacteriene pe cale de diviziune, ceea ce dovedește la fel natura ei nucleară. Folosindu-se această metodă, s-a constatat că toate celulele bacteriene au un nucleu. În interiorul sporilor, la fel, se poate pune în evidență, prin același procedeu, o formație nucleară. Această experiență a lămurit o problemă care a fost mult dezbătută în bacteriologie și anume problema colorării uniforme a celulei bacteriene. Colorarea uniformă este datorită prezenței în citoplasmă a unei cantități însemnate de acid ribonucleic. Înlăturînd acest acid, celula bacteriană nu se mai colorează uniform.

Piekarski (1938), Robinow (1944), Vendrely și Lipardy (1946) și alții obțin o colorare distinctă a nucleului bacterian prin metode și mai simple, și anume supunînd celulele unei ușoare hidrolize. Robinow, de exemplu în scopul colorării nucleului bacterian fixează lamele întîi în vapori de acid osmic, apoi în alcool și le supune, în urmă, unei hidrolize, timp de 9—15 minute la 50°C, cu acid clorhidric n/1. Frotiurile, după hidroliză, le colorează cu soluție Giemsa, constatînd că celulele bacteriene prezintă formații granulare intens colorate, dispersate în masa celulară colorată palid. Rezultate similare se obțin, după Knaysi (1946), prin cultivarea bacteriilor (*Bacillus mycoides*) într-un mediu fără compuși azotați. În aceste condiții, celulele consumă acidul ribonucleic din citoplasmă și în consecință bazofilia acestei părți din celulă se reduce.

În ultimul timp, cercetătorii au încercat rezolvarea problemei nucleului bacterian cu ajutorul microscopului electronic. Primele observații, în această privință, și cu acest aparat optic, sînt făcute

Fig. 12 — Corpusculii cromatici la bacterii (după **Robinow**)

1 — Bacillus mycoides; 2 — Escherichia coli; 3 — Proteus vulgaris; 4 — Bacillus mesentericus

Fig. 13 — Corpusculi cromatici la *Escherichia coli* (după **Robinow**)

Cultură de 2 ½ ore. Fixarea în tetraoxid de osmiu și clorură mercurică în alcool, hidroliză la 56—60° în ClH n/1. Colorație Giemsa. Se observă formații mai intens colorate care au fost socotite nuclei bacterieni

de Piekarski şi Ruska (1939). Ei constată că unele bacterii necolorate *(Sarcina alba, S. lutea, Bacillus subtilis, B. mycoides)* prezintă o structură omogenă şi că microscopul electronic nu permite deci să se pună în evidenţă, în masa lor celulară, părţi mai dense, mai opace, care ar corespunde nucleului şi părţi mai puţin dense, care ar corespunde zonei citoplasmatice. La alte bacterii şi anume la cele Gram negative şi nesporulate, autorii găsesc însă granule mai dense ca restul masei celulare, situate central sau spre unul din poli. Aceste formaţii se găsesc atît în celulele tinere (culturi de 24 de ore), cît şi în cele bătrîne (culturi de 8 zile), dar în cele din urmă granulele au dimensiuni mai mari decît în cele dintîi. Nu există însă nici o dovadă certă că aceste formaţii granulare reprezintă nucleul bacterian. Dimpotrivă, faptul că celulele bătrîne au granulaţii mai multe ca cele tinere, deci mai multă materie nucleară, pare să contrazică natura lor nucleară. Intr-adevăr, Belozerski (1947) a constatat, prin metode chimice, că celulele bătrîne au mai puţine nucleoproteide ca cele tinere. Or, dacă granulaţiile observate ar fi de natură nucleară, ar trebui, dimpotrivă, ca celulele bătrîne, cu nuclei mari, să aibă mai multe substanţe nucleoproteidice. Tot în sens negativ, trebuie interpretat şi faptul că asemenea formaţii nu se găsesc în toate celulele bacteriene. Alţi cercetători au repetat experienţele lui Piekarski şi Ruska, folosind un microscop electronic cu un voltaj mai înalt (150 kW) şi deci cu o putere de pătrundere mai mare, dar au ajuns la aceleaşi rezultate. Bacteriile ar avea, după aceşti autori, un nucleu difuz, nediferenţiat. Tratînd însă bacteriile (stafilococi, coci Gram negativ) timp de 2¼ ore cu o soluţie de 0,02% de bicarbonat de sodiu, ei obţin o permeabilizare a unor părţi din corpul bacterian, faţă de radiaţiile electronice în raport cu alte părţi. In interiorul celulei se desenau, în aceste condiţii, granulaţii în număr variabil, 1—5, şi de mărimi diferite, 140—360 milimicroni. Aceste granulaţii nu se dizolvau într-o soluţie de 2% acid azotic şi, izolate de celule, după dezintegrarea acestora prin vibraţii ultrasonore, dădeau reacţia Feulgen pozitivă. Cu toate acestea, autorii nu conchid, în mod definitiv, că aceste granulaţii reprezintă nucleul bacterian. In judecarea imaginilor obţinute cu microscopul electronic, trebuie să se ţină seama, spun autorii, de o serie de factori ca uscarea celulelor, coagularea plasmei celulare, condensarea unor constituenţi celulari, plisarea membranei etc., care pot modifica aspectul celulei.

Issaev, Kris şi Rukina au cercetat, la microscopul electronic, celule aparţinînd celor trei mari grupe bacteriene, coci, bacterii, bacili, neputînd, nici ei, ajunge la concluzii definitive. Celulele tinere sînt omogene. In celulele bătrîne (culturi de 36 de ore) se întîlnesc granulaţii, dar nu există nici o probă că ele reprezintă nucleul celulei respective.

Biriuzova (1949) constată, la fel, că în celulele bătrîne se pot observa granulaţii, dar ţinînd seama că ele se găsesc numai în unele celule şi nu în toate, conchide că ele sînt de natură lipoproteică şi constituie mai curînd rezerve alimentare decît nuclei.

Imşeneţki (1951) a examinat, tot în scopul rezolvării acestei probleme şi tot cu microscopul electronic, paralel, celule bacteriene cu nucleu tipic (o specie din genul *Sorangium,* grupul mixobacteriilor) şi celule bacteriene considerate ca anucleate *(Escherichia coli).* El a constatat că pe imaginile obţinute cu microscopul electronic, mixobacteriile au un nucleu, dar el lipseşte la celulele speciei *Escherichia coli.* Pentru înţelegerea faptelor

Scanned with OKEN Scanner

Corpusculi metacromatici de *Corynebacterium diphteriae*
Coloraţie Neisser

este bine să fie amintit că cele două specii examinate au, în medie, aceleaşi dimensiuni.

Rezultatele negative date de examenul cu microscopul electronic, cu privire la prezenţa nucleului, sînt datorite, după autorii care susţin existenţa unui nucleu distinct de citoplasmă, slabei puteri de pătrundere a radiaţiilor electronice. Această obiecţie nu este, după B i r i u z o v a, valabilă, întîi pentru că folosirea unor microscoape de înalt voltaj asigură pătrunderea masei celulare şi, în al doilea rînd, pentru că, în aceleaşi condiţii de lucru, în celulele nucleate ale ciupercilor inferioare sau chiar ale mixobacteriilor se pot pune în evidenţă nucleul şi citoplasma.

Aceste diverse date, privind structura endoplasmei bacteriene, ne arată că problema este foarte complexă şi încă nelămurită. Un fapt însă se poate desprinde din aceste multiple cercetări şi anume că celula bacteriană prezintă, în raport cu celulele celorlalte vieţuitoare, o structură proprie. Absenţa unui nucleu net diferenţiat de protoplasmă, precum şi absenţa nucleolului şi a membranei nucleare caracterizează morfologic bacteriile şi le deosebeşte de celelalte vieţuitoare monocelulare.

INCLUZII PROTOPLASMATICE

Celula bacteriană, pe lîngă incluziile deja descrise, poate conţine şi rezerve alimentare depozitate sub forma unor granulaţii citoplasmatice numite încă şi corpusculi metacromatici.

B a b e ş şi E r n s t au pus primii în evidenţă, la diverse specii bacteriene, una sau mai multe incluzii citoplasmatice rotunde, colorate metacromatic. Aceste formaţii, cunoscute sub numele de corpusculii Babeş-Ernst, sînt mai frecvent întîlnite la bacteriile din culturi vechi decît la cele care se înmulţesc energic, într-un mediu bogat în principii nutritivi. Pe baza afinităţii lor pentru culorile nucleare — hematoxilină — precum şi a constituţiei lor chimice (nu se găsesc la bacteriile cultivate în lichide lipsite de acid fosforic), unii cercetători au identificat aceşti corpusculi cu nucleul celular, alţii i-au socotit drept rezerve alimentare şi, în fine, alţii i-au atribuit un rol în formarea sporilor sau i-au considerat chiar spori bacterieni. B a b e ş (1895) afirmă că uneori corpusculii metacromatici pot da naştere la muguri sau ramuri laterale. În afara celulei, aceste granule, după unii autori, s-ar înmulţi sau ar da forma vegetativă obişnuită a bacteriei.

Cercetările experimentale au lămurit, în mod definitiv, aceste controverse şi au clasat corpusculi metacromatici printre granulaţiile care constituie rezerve alimentare pentru celula bacteriană. Într-adevăr, asemenea granule se găsesc şi la alte vieţuitoare monocelulare, levuri, la care nucleul este bine diferenţiat şi mai uşor de identificat, ceea ce exclude natura lor nucleară. Corpusculii metacromatici ai levurilor sînt distincţi de nucleu. În cursul formării sporilor, se observă consumarea acestor granulaţii, ceea ce la fel trădează natura lor alimentară.

Unii cercetători au făcut o legătură între prezenţa acestor corpusculi metacromatici şi virulenţa germenului respectiv. Autorii îşi sprijineau afirmaţia lor pe constatarea diferenţelor ce există, din acest punct de vedere, între bacilul difteriei şi cei pseudodifterici : primii sînt patogeni şi conţin corpusculi, iar cei din urmă apatogeni şi lipsiţi de corpusculi. Acest paralelism nu se constată însă la toate speciile bacteriene.

Scanned with OKEN Scanner

Corpusculii Babeş-Ernst au, la diverse specii bacteriene, afinităţi tinctoriale identice, ceea ce denotă o compoziţie chimică asemănătoare. Substanţa componentă a fost denumită volutină, pentru motivul că a fost identificată pentru prima oară la specia *Spirillum volutans*. Compoziţia chimică a volutinei nu a putut fi precizată. Ea se prezintă ca o substanţă cu o structură foarte complexă şi pare să rezulte din unirea acidului nucleinic cu o bază, probabil organică ; nu dă reacţiile caracteristice albuminelor.

În citoplasma bacteriană se mai găsesc, în afară de volutină, alte rezerve alimentare, ca granule de grăsime, lecitină, glicogen, amidon etc. Aceste diverse substanţe au fost identificate prin reacţii microchimice.

Scanned with OKEN Scanner

FIZIOLOGIA BACTERIILOR

COMPOZIŢIA CHIMICĂ A BACTERIILOR

Celula bacteriană are o structură chimică asemănătoare celorlalte vieţuitoare, remarcîndu-se totuşi, în opoziţie cu celelalte celule, o mai mare bogăţie în proteine şi acizi nucleici.

Elementele principale, care intră în compoziţia celulei bacteriene sînt C, N, H, O, P, S, Cl, K, Na, Mg, Ca. Aceste elemente au rol plastic. pe lîngă ele se mai găsesc şi unele elemente ca Fe, Zn, Mn, Cu, cu rol de catalizatori (oligoelemente sau infiniţi mici). Elementele plastice se găsesc în cantităţi mari şi constituie materia celulară ; catalizatorii intervin şi înlesnesc desfăşurarea proceselor fiziologice şi se găsesc în cantităţi infinetizimale în celulă.

Tabelul 3

Conţinutul în principalele elemente a cîtorva bacterii patogene în comparaţie cu organismul uman şi cu solul

		C	H	O	N	Cenuşă
		In procente faţă de bacterii uscate				
Specia bacteriană	Klebsiella pneumoniae	—	—	—	6,7	—
	Corynebacterium diphteriae	48,9	8,6	25,7	12,2	4,5
	Mycobacterium tuberculosis	64,06	7,33	16,70	9,87	6,9
	Bacillus anthracis	—	—	—	6,3	—
	Shigella dysenteriae	51,3	7,8	—	13,8	—
	Escherichia coli	—	—	—	13,7	—
	Vibrio cholerae	—	—	—	12,17 — 17,57	—
	Pasteurella animalium v. mammallium	—	—	—	9,33	—
	Pasteurella animalium v. avium	—	—	—	9,04	—
	Omul	21,15	9,86	62,81	3,10	—
	Solul	0,19	0,95	49,78	0,03	—

În celulă, aceste elemente sînt grupate, constituind molecule de mărimi variabile sub formă de apă, diverse săruri minerale, glucide, lipide, protide etc. Carbonul se găseşte în diverşi compuşi minerali sau organici, cum sînt : aminoacizii, glucidele. Azotul se găseşte în sărurile de amoniu, aminoacizi şi polipeptide, proteine simple şi complexe. Să cercetăm aceste diverse complexe chimice, arătînd natura, concentraţia şi rolul lor în celula bacteriană.

Apa este constituentul principal al celulei, ea reprezentînd cel puţin 3/4 din greutatea umedă totală. Ea este mediul în care se realizează toate procesele fizice (pH, osmoză etc.) şi chimice (reacţii de dezintegrare şi sinteză) necesare desfăşurării vieţii.

Tabelul 4

Conţinutul în apă a cîtorva specii bacteriene patogene în comparaţie cu omul şi unele specii animale

		Conţinutul în procente
Specia bacteriană	Klebsiella pneumoniae	84,2 — 84,5
	Corynebacterium diphteriae	83,6 — 84,5
	Mycobacterium tuberculosis	85 — 88
	Bacillus anthracis	80
	Vibrio cholerae	73,4
	Shigella dysentheriae	78,2
	Eberthella typhosa	78,9
	Pseudomonas aeruginosa	75
	Omul	58 — 66
	Iepurele	67
	Nevertebrate marine	95,39

Formele vegetative sînt mai bogate în apă ca sporii. Dispersate în apa de constituţie se găsesc diverse molecule, unele mari — proteine, nucleoproteide, glucido-lipide etc. — nedifuzabile, altele mai mici şi putînd traversa, în condiţii fiziologice, membrana bacteriană — glucide, aminoacizi, săruri minerale.

Sărurile minerale. În cenuşa bacteriană se găsesc diverse elemente ca K, Na, Mg, Ca, Cl, precum şi urme de Zn, Fe, Mn şi Cu. Unele din aceste elemente sînt indispensabile vieţii bacteriilor. Astfel, magneziul şi calciul s-au dovedit indispensabile pentru bacilul tuberculozei ; ele nu sînt absolut necesare, dar prezenţa lor favorizează creşterea bacililor tifosului, paratifosului şi difteriei. Potasiul este indispensabil bacilului tuberculozei şi favorizant pentru ale bacterii.

Sodiul nu este indispensabil pentru bacterii, dar prezenţa sa înlesneşte multiplicarea lor. Cuprul este fixat în cantităţi importante de bacilii difteriei.

Concentraţia sărurilor în celulele bacteriene variază, în primul rînd, în raport cu concentraţia acestor substanţe în mediu. Cultivîndu-se, de exemplu, vibrionul holerei în medii cu diferite concentraţii în săruri, s-au obţinut următoarele rezultate : cultivat în bulion cu 1% clorură de sodiu se obţin 8—10 g de cenuşă, din 100 g de bacili uscaţi la 105°C ; cultivat în

Tabelul 5

Influenţa mediului asupra conţinutului în cenuşă şi elemente a vibrionului holerei

Cenuşă	K		Na		Ca		Mg		Fe		P	
	În procente											
	Mediu	Bacterii	Mediu	Bacterii	Mediu	Bacterii	Mediu	Bacterii	Mediu	Bacterii	Mediu	Bacterii
Mediu I 6,02	0,455	0,42	6	0,76	0,66	0,13	0,245	0,09	0,039	0,08	1	1,48
Mediu II 5,10	0,69	0,48	5,40	0,76	0,25	0,076	0,13	0,15	—	—	—	—

Tabelul 6

Variaţiile compoziţiei în elemente a unor specii şi variante bacteriene

Specia bacteriană	K	Mg	Ca	Na	P	Fe
	În procente					
Escherichia coli	0,036	0,20	0,16	0,83	1,52	0,0175
Salmonella typhosa	0,22	0,27	0,14	0,92	0,52	0,0075
Salmonella typhi murium R	0,065	0,35	0,19	0,79	1,82	0,01
Salmonella typhi murium S	0,22	0,12	0,184	0,74	1,65	0,005
Staphylococcus albus	0,52	0,20	0,136	0,41	1,68	0,0075
Staphylococcus aureus	0,64	0,13	0,11	0,27	1,30	0,0105
Bacillus anthracis R	0,64	0,32	0,10	0,86	1,52	0,0066
Bacillus anthracis S	0,28	0,28	0,03	0,82	1,38	0,0066

bulion cu 3% clorură de sodiu, se obţin 22—28 g de cenuşă pentru 100 g de bacili uscaţi tot la 105°C.

Variaţia concentraţiei diverselor elemente în celulă în raport cu concentraţia lor în mediu este ilustrată şi în tabelul 5.

Aceste diverse observaţii dovedesc că celula bacteriană este dotată cu o accentuată plasticitate chimică, cu o însemnată putere de adaptare la mediu, ea putîndu-şi modifica cantitativ compoziţia chimică în raport cu constituţia mediului în care se multiplică. Limitele de variaţie sînt însemnate. Iată, de exemplu, care sînt aceste limite, în raport cu mediul ambiant, ale cîtorva componente ale celulelor speciei *Escherichia coli*.

H_2O ..... 60,2 —79,6
Cenuşă totală ..... 2,11—7,83
P_2O_5 ..... 0,92—4,22
Ca_2O_5 ..... 0,04—2,71

Această plasticitate nu trebuie însă exagerată şi nu trebuie să credem că o specie îşi pierde, în mod curent, constantele sale chimice în cursul procesului de adaptare. Celula bacteriană, în cursul acestor procese, îşi modifică raportul dintre anumite substanţe, dar nu substanţele înseşi ; acestea rămîn, de regulă, aceleaşi, şi pe această relativă fixitate a substanţelor complexe care compun celula se sprijină diferenţierea speciilor prin examenul serologic.

Alături de aceste variaţii, care sînt în raport cu mediul de cultură, Dîmboviceanu şi Barber (1931) au constatat diferenţe la diversele variante ale aceleiaşi specii. Astfel, după autori, aşa cum se vede în tabelul 6, formele R sînt mai bogate în cenuşă şi conţin cantităţi mai mari

Scanned with OKEN Scanner

de K, Ca, Mg, decît formele S. Bacilii cărbunelui virulenţi conţin mai multă cenuşă şi mai mult K ca cei atenuaţi, iar vaccinul „Pasteur II" conţine mai multă cenuşă ca vaccinul „Pasteur I". Aceste date ne arată că pierderea unor însuşiri biologice este legată de o modificare cantitativă a structurii elementare a celulei.

Glucidele au fost izolate şi identificate în celulele multor specii bacteriene. Natura lor este variabilă. Astfel celuloza, care este mult răspîndită în lumea vegetală, se găseşte rar la bacterii. Totuşi, unii autori o găsesc, de exemplu, în membrana speciei *Acetobacter xylinum ;* într-adevăr această membrană dă, în difracţie cu razele X, acelaşi tablou ca şi bumbacul. Hemiceluloze au fost identificate la unii germeni ca *Bacillus tuberculosis, B. subtilis* şi *Corynebacterium diphteriae.* Chitina, complex glucidic frecvent găsit la animale, a fost identificat şi la unele specii bacteriene ca *Bacillus anthracis, B. pyocianeus.* Diversele secreţii bacteriene de consistenţă mucoasă sînt, de regulă, de natură glucidică. Capsula pneumococilor, capsula pneumobacilului lui Friedländer etc. sînt constituite din polizaharide. Polizaharidul din capsula pneumococilor a fost îndeaproape studiat, stabilindu-se proprietăţile lui fizico-chimice, serologice etc. Polizaharide specifice au fost izolate de la numeroase specii ca : salmonele, bacilii dizenteriei, stafilococi, bacilii cărbunelui etc., dar, la aceste diverse specii, substanţa nu se găseşte în capsulă, ci în corpul bacterian. Polizaharidele sau poliholozidele bacteriilor Gram pozitive constituie, în corpul celular, complexe, probabil, glucidoproteice labile, ceea ce face ca să fie uşor separate şi izolate. Ele difuzează, de altfel, din abundenţă şi de timpuriu, în mediul de cultură.

Polizaharidele sînt chimic şi serologic caracteristice fiecărei specii sau tip bacterian. Ele sînt antigeni incompleţi, nu produc deci anticorpi, dar reacţionează specific cu anticorpii produşi prin inocularea la animale a germenilor totali sau antigenilor completi (complexul glucido-lipido-polipeptidic, în cazul bacteriilor Gram negative). Acestea reprezintă, în medie, 1% sau mai puţin din greutatea uscată a bacteriilor. În general, bacteriile Gram negative sînt mai bogate în polizaharide decît cele Gram pozitive. Astfel, din 100 g de bacili ai tuberculozei uscaţi, un cercetător a izolat, odată 0,97 g, iar altădată 0,5 g de polizaharid, în timp ce din 100 g de *Salmonella typhosa* s-au putut izola 3,6 g de polizaharid.

In afară de glucide complexe, în celula bacteriană s-au identificat şi substanţe glucidice mai simple. Astfel, au fost identificate o serie de hexoze ca d-glucoza, d-manoza şi d-galactoza. Dintre pentoze, d-arabinoza a fost găsită la bacilul turbeculozei, vibrionul holerei, bacilul difteriei etc. ; d-riboza şi dezoxiriboza intră în compoziţia acizilor nucleici şi, foarte probabil, că se găsesc la toate speciile bacteriene.

Pentozele şi, în special, hexozele constituie materia din care celula îşi sintetizează polizaharidele specifice. In acelaşi timp, ele servesc ca izvor principal de energie pentru celulă.

Lipidele au fost identificate în celulele diverselor specii bacteriene prin metode microchimice sau tinctoriale (colorare cu Sudan III). Ele au putut fi izolate pe cale chimică (metoda Anderson), putîndu-se astfel stabili atît concentraţia cît şi natura lor în celulele diverselor specii bacteriene.

Concentraţia în lipide variază de la o specie la alta. Stafilococii sînt cei mai săraci, iar bacilii tuberculozei cei mai bogaţi, alte specii ocupînd

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 7

Conținutul în lipide a cîtorva specii bacteriene

Specia bacteriană	Extras etero-alcoolic	Extras acetic	Extras cloroformic
	În procente față de substanța uscată		
Mycobacterium tuberculosis v. hominis	22,7—40,0		
Mycobacterium tuberculosis v. bovis	13,4		
Mycobacterium tuberculosis v. avium	15,26		
Bacillus anthracis	7,1		
Brucella abortus	5 — 6	15,8	10,7
Staphylococcus albus	2,8		

o situație intermediară, așa cum se vede în tabelul 7 și cum a fost precizat de diverși cercetători.

Natura lipidelor bacteriene a putut fi stabilită pentru unele specii. Astfel, bacilul tuberculozei umane conține grăsimi neutre și acizi grași liberi (6,20%), ceară (11,03%), fosfatide (6,54%). Bacilul tuberculozei bovine conține 3,34% grăsimi neutre și acizi grași liberi, ceară 8,5%, iar fosfatide 1,55%. În fine, bacilul tuberculozei aviare conține 2,19% grăsimi neutre și acizi grași liberi, 10,79% ceară și 2,26% fosfatide.

Complecșii glucido-lipidici au fost identificați, pentru prima oară, în țara noastră, de către Boivin și L. Mesrobeanu (1933). Autorii au identificat glucido-lipide în soma bacteriilor Gram negative; complexul are importante funcțiuni biologice și este responsabil, în parte, de acțiunea patogenă a bacteriilor care îl posedă.

Substanțele glucido-lipidice ocupă în celulă o poziție periferică, făcînd parte sau constituind membrana bacteriană. Ele se solubilizează tratînd suspensiile bacteriene fie cu acid tricloracetic (5%), fie cu tripsină, fie cu dietilen-glicol. Reprezintă în medie, 10% din greutatea uscată a corpilor bacterieni. Complexul este insolubil în solvenți organici, dar se solubilizează în apă, la pH=6,8, dînd o soluție ușor opalescentă. Este constituit din molecule mari și nu dializează chiar prin membrane de mare permeabilitate. Nu dă reacții pozitive pentru proteine-biuret, acid sulfosalicilic, tanin. Reacția

Tabelul 8

Proporția în care se găsesc diverse elemente în complexul glucido-lipidic extras din *Salmonella typhosa* (după Soru și Combiescu, 1938)

	C	H	N	P	Cenușă
	Grame element pentru 100 g de complex glucido-lipidic				
H. 901 (O + H)	46,40	7,5	1,40	1,85	9,86
V. 230 (O + H + VI)	49,00	8,0	2,30	2,14	10,86

pentru aminoacizi (ninhidrina) este negativă sau slab pozitivă. Conţine C, H, N, P şi alte elemente.

Complexul este stabil. Rezistă la acţiunea fermenţilor proteolitici. În soluţie neutră nu se distruge printr-o încălzire de 1 oră la 100°C. În mediu uşor acid (1 ml de acid acetic pentru 100 ml de soluţie şi la temperatura de 100°C timp de 2 ore), complexul se desface şi anume lipidele precipită, iar polizaharidul rămîne în soluţie. Soluţia de polizaharid este perfect limpede şi lipsită de toxicitate şi antigenitate, dar dă reacţii pozitive cu un ser specific.

Protidele sau **albuminele** constituie componenţii de bază ai celulei bacteriene, de altfel ca a tuturor celulelor animale sau vegetale. Cantitativ, aşa cum se vede din tabelul 9, ele reprezintă, în medie, jumătate din greutatea uscată a celulei. Protidele din celula bacteriană sînt reprezentate prin aminoacizi, peptide şi proteide.

Tabelul 9

Conţinutul bacteriilor patogene în protide (valori medii) în comparaţie cu omul (după Belozerski şi alţi cercetători)

		Protide în procente faţă de substanţa uscată
Specia bacteriană	Staphylococcus albus	54,9
	Corynebacterium diphteriae	63,4
	Mycobacterium tuberculosis	55,6
	Bacillus anthracis	42,0
	Vibrio cholerae	60,7
	Shigella dysenteriae	55,1
	Salmonella thyphosa	51,4
	Pseudomonas aeruginosa	48,8—60,7
	Proteus vulgaris	47,0
	Bacillus mycoides	52,4
	Sarcina flava (forma S)	65,3
	Sarcina flava (forma R)	66,6
Omul		39,5

Proteidele din corpul bacteriilor, ca şi din a tuturor vieţuitoarelor, în general, sînt împărţite în două grupe:

1. *Holoproteide, proteine* sau *albumine simple* constituite numai din aminoacizi cum sînt globulinele şi albuminele serice, protaminele, glutaminele, histonele etc.

2. *Heteroproteide, proteide* sau *albumine complexe* constituite din albumine cuplate cu grupe prostetice care nu sînt aminoacizi, cum sînt acizii nucleari (nucleoproteide), hemoglobina şi alţi pigmenţi (cromoproteide), fosfaţi (fosfoproteide). În celula bacteriană se găsesc ambele feluri de proteine. Albuminele simple au fost găsite în diversele celule bacteriene. Astfel, unii germeni conţin proteine de tip globulinic, coagulabile prin căldură şi precipitabile cu sulfat de amoniu. Prezenţa proteinelor cu caracter bazic de tipul protaminelor şi histonelor este pusă la îndoială de Belozerski şi colaboratorii săi. Proteinele simple ca şi cele obţinute prin hidroliza proteinelor complexe au fost analizate din punct de vedere al naturii aminoacizilor componenţi. Aceste cercetări au arătat că aminoacizii, liberi în celulă sau constituind peptide sau proteide bacteriene sînt, în general, tot acei care

se întîlnesc şi în alte celule de origine animală sau vegetală. Totuşi, după unele cercetări, bacteriile ar conţine şi unii aminoacizi neîntîlniţi la alte vieţuitoare. Astfel, la colibacili s-a identificat, prin metoda cromatografică, pantomina (acidul endoaminno-pp-dimetil-hidroxibutiric).

Tabelul 10

Conţinutul în azot şi diverşi aminoacizi la trei specii bacteriene

Specia	Azot	Histidină	Arginină	Lizină	Leucină	Izoleucină	Valină	Metionină	Threonină	Fenilalanină	Triptofan
	În procente faţă de substanţa uscată										
Staphilococcus aureus	10,75	0,72	2,3	5,3	3,4	2,8	2,4	0,81	2,0	1,84	0,22
Escherichia coli	13,19	1,26	4,3	4,5	6,4	3,8	4,5	1,7	3,2	2,7	0,74
Bacillus subtilis	10,07	0,87	2,4	3,4	4,8	3,0	3,5	1,08	2,2	2,2	0,48

Se observă, în general, variaţii importante cu privire la conţinutul diverselor specii sau rase bacteriene în aminoacizi. Cistina, de exemplu, se găseşte la multe specii bacteriene, dar în cantitate foarte mică, iar unele specii nu conţin de loc acest aminoacid. Formele capsulate de *Bacillus anthracis* posedă cantităţi însemnate de acid d-glutamic, deoarece el constituie cea mai mare parte din capsulă. Bacilii acidorezistenţi conţin cantităţi importante de l-fenilalanină. Acest aminoacid nu se găseşte la bacilii difteriei, care conţin, în schimb, cantităţi însemnate de tirozină. Acest din urmă aminoacid se găseşte şi în toxina bacilului, dar lipseşte în anatoxina sa.

Nucleoproteidele, dintre albuminele complexe, ocupă cantitativ şi calitativ un loc important în celula bacteriană. Cantitativ, Boivin şi Mesrobeanu găsesc că ele constituie 47% din greutatea uscată a stafilococului auriu, 55% din cea a bacilului piocianic. Belozerski (1939 — 1940) a găsit încă cifre şi mai ridicate şi el admite că nucleoproteida reprezintă 50—80% din greutatea uscată a celulelor bacteriene. Streptococii hemolitici, după alte cercetări, ar conţine în medie 80% nucleoproteide.

Nucleoproteidele, cel puţin unele din ele, sînt toxice. Rowland, în 1910, găseşte o asemenea nucleoproteidă în *Pasteurella pestis,* iar N. Stamatin, V. Georgescu şi colaboratorii în *Pasteurella animalium, Salmonella typhosa, Salm. suipestifer, Escherichia coli* şi alte bacterii Gram negative. La *Esch. coli,* nucleoproteida toxică reprezintă, în medie 16,4% din greutatea uscată a bacililor. Procentul de 16,4% nu reprezintă însă totalitatea nucleoproteidelor bacilare, ci numai fracţiunea toxică.

Conţinutul celulelor speciei *Pasteurella animalium,* în nucleoproteide toxice, variază în limite largi de la o tulpină la alta şi pentru aceeaşi tulpină de la o determinare la alta. Media pentru patru tulpini cercetate a fost de 20,48% cu limite de variaţii cuprinse între 8,93 şi 52,9% bacili uscaţi. Pentru aceeaşi tulpină, cifrele obţinute, la trei determinări, făcute la intervale de 2—3 luni, au fost de 8,93, 16,6, 14,2%. Conţinutul nucleoproteidei pasteurelice în azot a fost, în medie, de 9,19%, cu limite de variaţii cuprinse între 8,4 şi 10,50%.

Scanned with OKEN Scanner

Izolarea nucleoproteidelor toxice se face astfel:

1. suspensiile bacteriene spălate se tratează cu acid tricloracetic; concentrația finală a acidului în soluție este de 5%;
2. 24 de ore la gheţar, în care timp suspensia se agită de mai multe ori;
3. centrifugare; separarea lichidului de deasupra de către depozit;
4. depozitul de centrifugare se ia cu apă şi suspensia se alcalinizează cu soluție de Na OH n/10 pînă la roz la fenolftaleină;
5. cîteva ore la gheţar;
6. centrifugare; lichidul de deasupra conține în soluție nucleoproteida toxică;
7. precipitarea nucleoproteidei din soluție prin amestec cu patru volume de alcool şi acidifiere cu acid sulfuric pînă la o cifră aproximativă de pH=4,5;
8. după 24 de ore centrifugarea; depozitul obținut conține nucleoproteida; ea este solubilizată în apă la pH=8,2—8,4 (roz la fenolftaleină). Purificarea ei se poate realiza prin precipitări cu alcool etilic în zona acidă şi solubilizări în apă alcalină.

Nucleoproteidele bacteriene, ca şi nucleoproteidele de origine animală sau vegetală, se scindează prin hidroliză sau prin intermediul fermenţilor în proteină şi nucleină. Aceasta din urmă, mai departe, se scindează în acizi nucleici şi proteine. Acizii nucleici la rîndul lor se desfac prin hidroliză în: a) baze purinice (adenina, guanina, xantîna etc.) sau pirimidinice (timina, uracilul, citozina); b) un monozaharid şi c) acid fosforic.

Acizii nucleici pot fi liberi în celula bacteriană sau cuplaţi cu albumină. Ei pot conține ca baze purinice adenina sau guanina, iar ca baze pirimidinice timina, citozina sau uracilul. Astfel, guanina şi adenina au fost identificate în nucleoproteida de la *Bacillus anthracis,* citozina şi uracilul la *Vibrio cholerae,* guanina, adenina, citozina, uracilul şi timina la *Salmonella typhi murium,* guanina, adenina, şi citozina la speciile din genul *Brucella.* Zaharul acidului nucleic bacterian poate fi o riboză sau o dezoxiriboză. Acizii nucleici care conţin riboză, adică acizi ribonucleici, se găsesc în citoplasmă şi ei reprezintă 5—10% sau chiar 15—20% din greutatea uscată a bacteriilor. Acizii nucleici care conţin dezoxiriboză, adică acizi dezoxiribonucleici, se găsesc în nucleu şi ei reprezintă 1—5% din greutatea uscată a bacteriilor.

Concentraţia acizilor nucleici variază, aşa cum au arătat diverşi cercetători, de la o specie bacteriană la alta. In comparaţie cu alte celule animale sau vegetale, bacteriile sînt foarte bogate în acizi nucleici şi nu sînt depăşite decît de celulele din timus, de unele celule de reproducere şi de ţesuturile embrionare ale plantelor superioare.

Tabelul 11

Variaţii privind conţinutul în acizi ribo- şi dezoxiribonucleic la diverse specii bacteriene

Specia bacteriană	Acid nucleic	Acid ribonucleic	Acid dezoxiribonucleic
	În procente faţă de substanţă uscată		
Escherichia coli	13,9	9,7	4,2
Bacillus anthracis	4,3	3,2	1,1
Staphylococcus pyogenes	11,5	8,7	2,8
Salmonella typhosa	12,8	9,1	3,7
Salmonella typhi murium	8,4	5,4	3,0
Streptococcus pyogenes	20	14—18	2—5
Gonococul	20	—	—

Scanned with OKEN Scanner

Din cercetarea datelor tabelului 11 se mai observă că bacteriile nesporulate sînt mai bogate în acizi nucleici decît cele sporulate şi că, în general, celulele bacteriene conţin mai mult acid ribonucleic decît dezoxiribonucleic. Conţinutul în acid ribonucleic variază de la o specie la alta, de la o grupă de specii la alta, dar şi în cadrul aceleiaşi specii, în raport cu starea fiziologică. In această privinţă, s-a constatat că la bacterii, ca şi la celulele animale şi vegetale, faza de multiplicare, deci de sinteză activă a substanţelor proteice, este însoţită de o creştere a concentraţiei în acid ribonucleic.

Iată, după Belozersky, care este, pentru cîteva specii, concentraţia în acizi nucleici ribo- şi dezoxiribonucleic) şi proteine la culturi de diverse vîrste.

Tabelul 12

Concentraţia acizilor nucleici şi a proteinelor la culturi de diferite vîrste

Specia bacteriană	Vîrsta culturii	Acizii nucleici	Proteine
		În procente faţă de substanţa uscată	
Escherichia coli	5 ore	22,43	57,0
	20 ore	14,13	72,4
	48 ore	9,66	70,4
Bacillus paradysenteriae Flexner	5 ore	28,18	61,0
	20 ore	19,97	74,0
	48 ore	14,77	70,9

AFINITĂŢILE TINCTORIALE ALE BACTERIILOR

Proprietăţile fizico-chimice ale celulei bacteriene determină afinităţile sale tinctoriale. Pătrunderea soluţiei colorante în celulă este un fenomen fizico-chimic, el rezultînd din fixarea colorantului, din combinarea acestuia cu materia celulară, în special cu substanţele albuminoide. Natura chimică a procesului de fixare rezultă, în primul rînd, din constatarea că albastrul de metilen, după fixarea sa pe celulă, este redus mai greu ca înainte de fixare, ceea ce înseamnă că el nu mai este liber, ci integrat într-un complex chimic. Pe de altă parte, se constată, în acelaşi sens, că proteina care a fixat colorantul îşi modifică, la rîndul ei, proprietăţile. Mai departe, s-a observat că celulele dezalbuminate prin autoliză pierd capacitatea de a fixa coloranţii, ceea ce dovedeşte rolul albuminei în procesul de colorare. Pneumococii, de exemplu, care, în anumite condiţii, pierd, prin solubilizare în mediu, părţi din acidul ribonucleic şi din nucleoproteide, devin Gram negativi.

Afinitatea celulei bacteriene pentru coloranţii acizi ca şi pentru cei bazici rezultă din natura amfoteră a albuminelor pe care le conţine. Este recunoscută însă o afinitate mai mare a materiei bacteriene pentru coloranţii bazici decît pentru cei acizi şi, de aceea, în mod practic, pentru colorarea bacteriilor se folosesc coloranţii bazici.

Structura fizico-chimică a diverselor specii bacteriene fiind diferită, modul de comportare faţă de soluţiile colorante va fi deosebit. Unele bacterii se colorează uşor, altele greu. Formele bacteriene care conţin apă puţină au afinitate mai redusă pentru soluţia colorantă. Cilii şi sporii probabil că se colorează greu din cauza acestei particularităţi de constituţie. Unele substanţe care se găsesc în învelişul extern al celulei pot împiedica pătrunderea soluţiei colorante. Astfel se comportă acizii graşi liberi, precum şi ceara care constituie învelişul extern al bacilului tuberculozei. Unii autori au arătat că bacilii tuberculozei trataţi cu eter, deci dezbrăcaţi de învelişul lor lipidic, pierd acidorezistenţa, iar pe de altă parte, că *Bacillus anthracis* devine acidorezistent, cînd se multiplică în medii în care a fost deja cultivat bacilul tuberculozei. Fenomenele care succed morţii celulei modifică afinitatea acesteia pentru diversele soluţii colorante. Granulele rezultate din liza vibrionilor holerei, sub influenţa anticorpilor specifici, se colorează încă cu fuxină, dar nu mai au afinitate pentru albastrul de metilen. În general, celulele bacteriene moarte se colorează mai palid ca cele vii.

Metodele elective de coloraţie se sprijină pe diferenţele de afinitate dintre substrat şi soluţia colorantă. Soluţia Giemsa, de exemplu, colorează capsula bacilului cărbunelui în violet, iar corpul aceluiaşi bacil în albastru. Cei doi componenţi celulari fixează colorantul pentru care fiecare are afinitate şi dă cu el o anumită culoare. Metoda de coloraţie Gram simplu colorează unele bacterii — pe cele Gram pozitive — şi nu colorează pe altele — pe cele Gram negative. Acest mod de comportare a bacteriilor faţă de aceleaşi substanţe se datoreşte, la fel, diferenţelor de componenţă chimică. Bacteriile Gram pozitive conţin substanţe care formează cu soluţia colorantă şi cu iodul un complex insolubil în alcool-acetonă. Care sînt substanţele celulare care formează acest complex insolubil? Unii autori afirmă că lipidele superficiale ale celulei — acizi graşi nesaturaţi şi fosfatidele — care există sub o anumită formă numai la bacteriile Gram pozitive, se combină cu iodul constituind astfel un strat extern impermeabil pentru soluţia colorantă (violetul de genţiană), fixată în celulă, în primul timp al coloraţiei. Boivin găseşte şi el în diferenţele de structură chimică a bacteriilor explicaţia modului deosebit de comportare faţă de metoda Gram. Bacteriile Gram negative au drept principal constituent antigenic o substanţă glucido-lipido-polipeptidică, în timp ce la cele Gram pozitive, după toate probabilităţile, el este un polizaharid cuplat cu o nucleoproteină. Acest complex este după Boivin, răspunzător de constituirea acelui produs insolubil în alcool-acetonă, caracteristic bacteriilor Gram pozitive. Tarsievici (1947) constată, în acelaşi sens, că celulele speciei *Saccharomyces cerevisiae* se transformă din Gram pozitive în Gram negative, după extragerea acidului nucleic. Alte bacterii, care reţin, la fel, colorantul Gram, pierd această proprietate după extragerea acidului ribonucleic; şi Knaysi afirmă că reţinerea colorantului Gram se datoreşte prezenţei ribonuclatului de magneziu în straturile superficiale ale celulei. Aceste date par a arăta că acidul nucleic intervine în mod hotărîtor în constituirea complexului insolubil în metoda Gram.

Capacitatea colorantă a unui produs este în funcţie şi de starea fizică a acestuia în solvant. Se observă, în acest sens, că soluţiile adevărate au o putere tinctorială redusă, în timp ce suspensiile de coloranţi au o activi-

Scanned with OKEN Scanner

tate tinctorială mai însemnată şi ea este cu atît mai mare cu cît amestecul este mai puţin stabil. Acizii măresc gradul de solubilitate a coloranţilor şi, în consecinţă, colorează slab bacteriile; alcalii, dimpotrivă, accentuează instabilitatea colorantului în solvant, îi măresc tendinţele de precipitare şi deci şi de coloraţie.

FERMENŢII BACTERIENI

Fermenţii sînt coloizi organici dotaţi cu capacitatea de a mijloci, în condiţii compatibile cu viaţa, diverse reacţii chimice, înăuntrul şi în afara organismului, fără ca ei să intre propriu-zis în reacţie. Acţiunea lor este deci de tip catalitic. Bacteriile posedă un aparat enzimatic care variază, în anumite limite de la o specie la alta.

Acţiunea fermenţilor s-a folosit, în diverse scopuri casnice, de foarte multă vreme — antichitate — dar natura acestei acţiuni nu a început a fi studiată decît în secolul al XVIII-lea. Van Helmont, printre primii, afirmă că fermentaţia zahărului se datoreşte unui excitant special, iar Lavoisier demonstrează că sub acţiunea unui asemenea excitant zahărul se transformă total în CO_2 şi alcool. Payen şi Persoz fac un pas hotărîtor în cercetarea fermenţilor, izolînd, în 1832, prin precipitare cu alcool, amilaza din orzul încolţit. Ei numesc substanţa izolată diastază, de la cuvîntul grecesc *„diastasis"*, care înseamnă a separa (fermentul separă diverse fracţiuni chimice din amidon).

Mai tîrziu, teoria lui Berzelius şi Mitscherlich, privind cataliza şi catalizatorii, a înlesnit o înţelegere mai justă a procesului fermentativ.

In urma lucrărilor lui Pasteur, se admitea că fermentul este însăşi vieţuitoarea microscopică, bacterie sau ciupercă, în prezenţa căreia se produce fermentaţia, dar lucrările lui Buchner (1897) au dezminţit această ipoteză. Buchner a arătat că celula nu acţionează direct asupra masei fermentescibile, ci prin fermenţii pe care îi posedă. Cercetătorul reuşeşte să izoleze, într-adevăr, din drojdia de bere, fermentul — zimaza — care produce fermentaţia alcoolică în afara prezenţei celulelor. Cercetările care au urmat au îmbogăţit şi mai mult cunoştinţele noastre despre fermenţi şi rolul lor în celulă şi în afara ei.

Compoziţia chimică. Enzimele, din punct de vedere al compoziţiei lor chimice, sînt materii proteice. Molecula proteică are pe suprafaţa sa grupe prostetice, care realizează catalitic acţiunea fermentativă. Grupele prostetice ale unor fermenţi au putut fi separate, desprinse din ferment. Fermenţii sînt deci constituiţi din două molecule distincte: una cu greutatea moleculară mare, care este o proteină în stare coloidală numită *apoferment, fenon* sau *suport coloidal,* alta cu greutate moleculară mică, numită *coferment, agon* sau *grupare activă.*

Clasificarea fermenţilor. Fermenţii bacterieni pot fi clasificaţi din următoarele puncte de vedere:

I. viteza de acţiune
II. poziţia lor în raport cu celula
III. răspîndirea la diverse specii
IV. modul de acţiune

I. Enzimele bacteriene, privite din punct de vedere al vitezei lor de acţiune, pot fi împărţite în două categorii : *enzime adaptive* şi *enzime constituitive* : primele rezultă dintr-o adaptare la mediu şi se nasc sub influenţa substratului chimic, cele din urmă sînt independente de mediu şi ele preexistă în celula bacteriană. *Aerobacter aerogenes,* de exemplu, fermentează, printre alte substanţe, glucoza şi xiloza. Enzima activă faţă de glucoză este constituitivă, pentru că o găsim în orice mediu de dezvoltare a bacteriei respective, fie că are sau nu glucoză, în timp ce enzima activă faţă de xiloză este adaptivă, pentru că nu o găsim decît în mediile în care se găseşte această substanţă. Tot aşa, *Saccharomyces cerevisiae* posedă o enzimă constituitivă faţă de glucoză şi alta adaptivă faţă de galactoză.

Enzimele adaptive nu încep activitatea lor fermentativă decît după un timp de contact dintre germeni şi substratul fermentescibil, timp necesar formării enzimei respective. Enzimele constituitive nu au nevoie de un asemenea răgaz, ci ele descompun substratul îndată ce bacteria care le conţine a venit în contact cu el.

II. Priviţi din punct de vedere al raportului lor cu celula care le fabrică, fermenţii bacterieni pot fi împărţiţi în două categorii :

1. exofermenţi
2. endofermenţi

Exofermenţii iau naştere în celulă, dar ei difuzează în mediul ambiant (se mai numesc, pentru acest motiv, şi fermenţi difuzibili) şi aici ei acţionează asupra substratului, transformîndu-l în molecule mici care pot fi absorbite şi asimilate de celula bacteriană.

Exofermenţii, găsindu-se în afara celulei, pot fi uşor izolaţi din mediile de cultură. Astfel, gelatinaza este un exoferment care topeşte gelatina. El se găseşte la numeroase specii bacteriene care se numesc, pentru acest motiv, gelatinolitice. Stafilococii patogeni, *Bacillus anthracis, B. subtilis, Vibrio cholerae, Pseudomonas punctata* etc. sînt bacterii gelatinolitice. Ele se dezvoltă în gelatină şi mediul, iniţial solid, devine lichid sub acţiunea acestor fermenţi. Dovada că liza gelatinei este produsă de un exoferment se face examinînd, din acest punct de vedere, fie filtratul unei culturi de bacterii gelatinolitice, fie cultura integrală încălzită la o temperatură care omoară celulele, dar nu fermenţii (60°C pentru culturile de vibrionul holerei). Examenul acestor produse, lipsite total de bacterii (filtratele) sau lipsite de bacterii vii (culturile încălzite), a arătat că ele sînt active şi lichefiază gelatina. Activitatea gelatinolitică a putut fi măsurată la diverse specii sau la diversele tulpini ale aceleiaşi specii.

S-a constituit, în acest scop, o unitate de măsură — unitatea gelatinolitică. Ea reprezintă, după R a m o n, cantitatea minimă de filtrat care lichefiază, în 4 ore la 45°C, 1 ml dintr-un amestec de 3 g de gelatină la 100 ml de apă fiziologică.

In afară de gelatinază, bacteriile posedă şi alţi exofermenţi, avînd fie acţiune proteolitică, fie lipolitică sau amilolitică.

Endofermenţii se nasc, rămîn şi acţionează în mediul celular. Ei mijlocesc, pe de o parte, reacţii care clădesc materia vie, iar, pe de altă parte, pun la dispoziţia celulei energia necesară. Fermenţii de acest tip nu difuzează în mediu, ei acţionează, în mod obişnuit, în plasmă vie. Ei nu pot fi separaţi de aceasta prin filtrare sau încălzire, din cauză că au, spre

Scanned with OKEN Scanner

deosebire de fermenţii difuzibili, aceeaşi sensibilitate faţă de diverşi factori fizici sau chimici ca şi celula bacteriană din care fac parte integrantă. In condiţii de lucru care nu alterează materia vie, aceşti fermenţi au putut fi totuşi separaţi de celulă. Astfel, B u c h n e r, după cum s-a spus, a izolat, din levurile care provoacă fermentaţia alcoolică a zaharurilor, fermentul — zimaza — răspunzător de această activitate şi care, în absenţa celulelor, a provocat acelaş proces fermentativ ca şi în prezenţa lor. Dehidrogenaze active faţă de diverse glucide au putut fi izolate din culturi de *Escherichia coli*. Aceşti fermenţi dehidrogenează glucidul şi hidrogenează acceptorul: albastrul de metilen, de exemplu, este redus printr-o hidrogenază într-o leucobază incoloră.

Modul de acţiune al fermenţilor nu este cunoscut.

Ipotetic se admite că reacţiile chimice mijlocite de enzime se petrec în doi timpi: întîi enzima este integrată în moleculă şi apoi molecula, ca o consecinţă a acestei integrări, este activată, adică configuraţia ei este astfel schimbată încît ea îşi pierde stabilitatea, făcînd posibilă ieşirea sau intrarea unui nou element. Alţi cercetători cred însă că enzima se combină pe de o parte cu donatorul, iar pe de altă parte cu acceptorul; complexul chimic astfel constituit este foarte activ şi un rearanjament al elementelor constituente devine posibil; în aceste condiţii hidrogenul trece, în procesele de dehidrogenare şi hidrogenare, de la donator la acceptor.

III. Fermenţii bacterieni, priviţi din punct de vedere al răspîndirii lor la diversele specii, pot fi clasificaţi astfel:

A. Fermenţi prezenţi la toate bacteriile, aerobe sau anaerobe. In acest grup se găsesc:

1. Fermenţi sintetizanţi ai materiei vii, care determină procese consumatoare de energie şi sînt endogeni.

2. Fermenţi dezintegranţi (hidrolaze) ai moleculelor complexe şi care determină procese eliberatoare de energie. Aceşti fermenţi pot fi:

a) endogeni (endofermenţi);
b) exogeni (exofermenţi);
c) respiratori, în sens larg, ca dehidraze, oxidoreductaze etc.

B. Fermenţi respiratori prezenţi numai la aerobi: oxidaze, catalaze, peroxidaze, citocromi; toţi aceşti fermenţi conţin fier şi sînt inhibaţi cu CO_2 şi CNH.

IV. Fermenţii, priviţi din punct de vedere al reacţiilor pe care le catalizează, se pot împărţi astfel (K u z i n, 1946).

A. Hidrolaze, adică fermenţii care grăbesc reacţiile de hidroliză. In această grupă se găsesc următorii fermenţi:

1. Esteraze (hidrolizează esterii compuşi):

a) lipaze;
b) fosfataze şi altele.

Un studiu al fosfatazelor bacteriene (fosfomonoesterazelor) a fost făcut, printre alţii, de L. M e s r o b e a n u, E. D o r i n şi N. M i t r i c ă (1948). Autorii au determinat prezenţa fosfatazelor la diverse specii, pH-ul optim de acţiune, variaţii în raport cu tipurile bacteriene etc.

2. Carbohidraze (hidrolizează zaharurile complexe):

a) hexoxidaze (lactaze, zaharaze);
b) poliaze (amilaza şi altele);
c) nucleaze.

Scanned with OKEN Scanner

3. Amidaze.
4. Peptidaze.
5. Proteaze.

B. Desmolaze, adică fermenţi care, mijlocind procesele oxidoreductoare, stau la baza fermentării hidraţilor de carbon şi respiraţiei. În acest grup se găsesc:

1. Sistemele fermentative ale hidraţilor de carbon amintite mai sus, carbohidraze, precum şi alte sisteme active faţă de hidraţi de carbon mai simpli.

2. Dehidraze sau hidrogenaze, adică fermenţii activatori şi purtători de hidrogen şi care nu lipsesc din nici o celulă. Există trei categorii de enzime purtătoare şi activatoare de hidrogen:

a) hidrogenaza, care activează hidrogenul molecular şi-l transmite unui acceptor, *Bacillus panthtophus,* de exemplu, activează hidrogenul molecular şi-l cuplează cu oxigenul molecular atmosferic ($2H_2+O_2=2H_2O$); procesul este exotermic şi deci de natură respiratorie;

b) dehidraze, care activează şi transportă hidrogenul de la un donator la un acceptor;

c) hidrogenliaze, care activează hidrogenul unui donator, dar nu-l transmite unui acceptor, ci îl pune în libertate sub formă de gaz molecular.

3. Carboxilaze.
4. Carboligaze.
5. Peroxidaze şi catalaze.

Peroxidazele şi catalazele sînt fermenţi care descompun peroxidul (H_2O_2), ce se produce în cursul proceselor de respiraţie aerobă. Peroxidul nu se conservă, de obicei, ca atare în ţesuturi (dată fiind nocivitatea sa, această conservare ar face viaţa imposibilă), ci el este descompus de fermenţi fero-porfirinici — peroxidaze, catalaze — şi, după unii cercetători, chiar de citocrom.

Peroxidaza transferă oxigenul din peroxid, unei substanţe oxidabile. Ea este un ferment fero-porfirinic cu funcţii oxidante şi mijloceşte cuplarea hidrogenului rezultat din procesele de dehidrogenare cu oxigenul peroxidului. Reacţia se petrece în mod schematic astfel:

$$\text{donator} - H_2 \text{ (peroxidază)} + H_2O_2 = \text{donator} + 2H_2O$$

Catalaza inactivează peroxidul descompunîndu-l în oxigen molecular şi apă ($2H_2O$ + catalază = $2H_2O + O_2$). Reacţia este exotermică şi energia rezultată poate fi folosită de celule. Anaerobii stricţi nu conţin catalază decît excepţional şi în cantităţi foarte mici. Catalaza conţine fier şi se găseşte constant în celulele cu respiraţie aerobă.

6. Sisteme de fermenţi oxidanţi se găsesc la bacteriile aerobe ca şi în ţesuturile animale. Aceşti fermenţi cum sînt citrocromul, indofenolozidaza etc. au funcţiuni respiratorii importante.

Citocromul a fost descoperit de Keilin şi este unul din cei mai importanţi fermenţi respiratorii (Lichtenthaeler, 1944). El poate fi oxidat de oxigenul molecular prin intermediul indofenoloxidazei şi redus în hidrogen prin intermediul dehidrazelor. Se găseşte în ţesuturile animale, vegetale, precum şi la bacterii aerobe. Conţine fier. Spectroscopic s-au putut identifica patru varietăţi de citocrom. Unele specii bacteriene ca *Bacillus anthracis, B. tuberculosis hominis, B. pyocianeus, Pasteurella animalium,*

Scanned with OKEN Scanner

Brucella abortus etc., conţin toate cele patru varietăţi de citocrom — a, b, c şi d. *Mycobacterium tuberculosis bovis şi avium, Salmonella suipestifer, Salm. typhi murium, Salm. enteritidis* Gärtner etc. conţin trei varietăţi a, b şi d, iar alţi germeni ca bacilul rujetului, *Streptococus mastitidis, Str. acidi lactici,* precum şi toţi anaerobii stricţi ca *Bacillus perfringens, Clostridium oedematiens, Cl. oedematis maligni, Cl. botulinum, Cl. tetani, Cl. histolyticum, Cl. chauvei* etc., nu conţin nici o varietate.

Indofenoloxidaza sau *nadioxidaza* este un ferment oxidant; în respiraţia aerobă ea oxidează, prin oxigenul atmosferic, citocromul. Acţiunea sa este înhibată de CO, SH_2 şi CNH. Conţine fier. Dă, oxidînd dimetilendiamina-alfa naftol, o culoare albastră. Se găseşte constant la unele specii aerobe ca: *Bacillus anthracis, B. subtilis, B. mallei,* inconstant la altele ca: *Brucella abortus, Salmonella suipestifer, Escherichia coli;* lipseşte din celulele speciilor strict anaerobe, precum şi din celulele unor specii (streptococi, micrococi, sarcine, salmonele) facultativ aerobe.

VARIAŢII PRIVIND ECHIPAMENTUL ENZIMATIC AL UNEI SPECII

Echipamentul enzimatic al unei specii bacteriene este, în mod practic, constant; într-adevăr, majoritatea tulpinilor dintr-o specie se comportă, din punct de vedere al puterii lor fermentative, în acelaşi fel: colibacilii fermentează lactoza, pasteurelele — zaharoza, salmonelele — glucoza etc. Proprietăţile fermentative şi deci echipamentul enzimatic al bacteriilor nu este însă absolut constant, el fiind, în cadrul aceleiaşi specii, supus fluctuaţiilor. Astfel, ca să rămînem la exemplele de mai sus, s-au izolat tulpini de *Salmonella,* care fermentează lactoza, precum şi tulpini de colibacili, care nu fermentează lactoza, tulpini care se abat deci de la tipul obişnuit al speciilor cărora aparţin. Asemenea variaţii au fost constatate la diverse specii; ele se produc sub influenţa factorilor de mediu, şi astăzi este definitiv demonstrat că proprietăţile fermentative nu au o fixitate absolută şi, în consecinţă, ele nu pot fi folosite ca singurele criterii de diferenţiere a speciilor bacteriene. Ele au însă o importantă valoare de diagnostic şi nu pot fi înlăturate ca mijloace de cercetare; rezultatele obţinute trebuie însă coroborate cu alte date privind morfologia şi fiziologia bacteriană.

RESPIRAŢIA LA BACTERII

Bacteriile respiră, ceea ce în sensul obişnuit al cuvîntului înseamnă că ele consumă oxigen şi elimină bioxid de carbon. Această însuşire a fost demonstrată utilizîndu-se aparatul lui Warburg. Folosindu-se acest aparat, s-a putut stabili, de exemplu, că 1 g de celule bacteriene, aparţinînd speciei *Escherichia coli,* consumă 100 mm^3 de O_2 pe minut, iar 1 g de *Bacillus subtilis* consumă 350 mm^3 de O_2 pe minut.

Oxigenul, pentru unele specii bacteriene, îndeplineşte exact aceleaşi funcţiuni ca şi pentru ţesuturile animale. După cum se ştie, în cazul acestora din urmă, oxigenul adus la ţesuturi de către plasma oxigenată este folosit în procese de oxidaţie, adică pentru a produce, cu ajutorul lui, reacţii chimice exoterme, eliberatoare de energie. Aceste procese pun la dispoziţia

Scanned with OKEN Scanner

celulei energia necesară desfăşurării proceselor vitale. Schematic reacţia se petrece astfel: oxigenul, adus la nivelul ţesuturilor, se combină cu hidrogenul luat de la un donator (substanţă hidrocarbonată sau de altă natură), dînd peroxid. Faptul esenţial, în procesul respirator, îl constituie, pe de o parte, activarea oxigenului (teoria Bach şi Oparin, 1927), iar pe de altă parte activarea hidrogenului (teoria Paladin, 1916, Wieland, 1922).

Fenomenul cuplării oxigenului cu hidrogenul nu este direct, ci el se face prin intermediul unui grup de fermenţi, aşa cum se vede în schema următoare:

$$\text{donator} - H_2 + \text{dehidrază} = \text{dehidrază} - H_2 + \text{donator}$$
$$\text{dehidrază} - H_2 + \text{citocrom} = \text{citocrom} - H_2 + \text{dehidrază}$$
$$\text{oxidază (fero)} + O_2 = \text{oxidază (feri)}\ O_2$$
$$\text{citocrom} - H_2 + \text{oxidază} - O_2 = \text{citocrom} + \text{oxidază} + H_2O_2$$

Respiraţia se face după aceeaşi schemă la un grup important de bacterii, însă nu la toate. Intr-adevăr, încă înainte de a se studia mai în amănunt procesul respirator la bacterii, adică procesul schimburilor gazoase, s-a constatat, de Pasteur, că unele specii bacteriene nu folosesc oxigenul şi, mai mult încă, ele nu se dezvoltă în prezenţa acestui gaz.

Dacă aceste bacterii se dispensează de oxigen, atunci cum îşi procură ele energia necesară multiplicării, construirii materiilor vii? Răspunsul la această întrebare a fost dat mai tîrziu. Aceste bacterii care nu consumă oxigen şi care se numesc pentru acest motiv „anaerobe" îşi procură energia prin procese chimice exotermice, care se petrec însă în afara prezenţei oxigenului. Ele respiră fără oxigen. Aceste constatări, pe lîngă altele, au dus la modificarea conţinutului noţiunii de proces respirator, în sensul că se numeşte proces respirator orice reacţie chimică eliberatoare de energie, care se petrece in vivo.

Bacteriile anaerobe respiră deci. Ele îşi procură energia oxidînd, prin fermenţii lor, substanţele de acelaşi tip ca şi aerobii. Ele dehidrogenează aceste substanţe, adică le oxidează, prin dehidrogenazele pe care le posedă, dar în loc ca acest hidrogen să fie cuplat cu oxigenul, îl fixează pe o altă substanţă reductibilă. Ele folosesc deci un alt acceptor de hidrogen decît oxigenul [1]. In consecinţă, pentru ca bacteriile anaerobe să se multiplice, este necesar ca asemenea acceptori să se găsească în mediile de cultură. Natura acestor acceptori este variată. Astfel nitraţii, acidul fumaric, acidul ascorbic, cisteina, glutationul, albastrul de metilen etc. pot fi folosiţi de anaerobi ca acceptori de hidrogen. Albastrul de metilen este un acceptor de hidrogen mai interesant decît ceilalţi, pentru că este, în acelaşi timp, şi un indicator al procesului de oxidoreducţie. Intr-adevăr, acceptînd hidrogenul în molecula sa, el se decolorează, din cauză că oxidîndu-se se transformă într-o leucobază incoloră. Atunci cînd un mediu de cultură, colorat cu o picătură dintr-o soluţie apoasă de albastru de metilen, se decolorează în urma însămînţării cu o bacterie, este semn că în mediu au loc procese de oxidoreducţie, că bacteria este vie. Această constatare şi-a găsit aplicaţii practice. Astfel, s-a folosit acest test pentru a pune în evidenţă exis-

[1] De altfel, unele cercetări şi recent Frenchel şi Karpenko (1953) arată căci chiar anaerobii stricţi folosesc cantităţi reduse de oxigen atunci cînd acest gaz este prezent în mediu.

tența germenilor vii într-un mediu însămînțat cu o specie microbiană, care dă culturi puțin vizibile. I. Popovici și colaboratorii (1951) au aplicat acest test, de exemplu, pentru microbul agalaxiei contagioase a oilor. Un mediu conține germenii agalaxiei cînd, închis ermetic într-o fiolă decolorează mediul colorat în prealabil cu soluție de albastru de metilen. Închiderea ermetică a mediului este necesară pentru motivul că, în prezența oxigenului, mediul se colorează din nou, leucobaza incoloră fixînd oxigenul atmosferic pe care l-a pierdut.

Ne putem întreba acum de ce bacteriile anaerobe nu pot folosi oxigenul și de ce, pentru unele din ele, acest gaz este toxic. Incapacitatea de a folosi oxigenul ca acceptor de hidrogen se datorește după unii cercetători, faptului că bacteriile anaerobe sînt lipsite, în primul rînd, de citocrom, deci de fermentul care poate preda hidrogenul oxigenului activat care face legătura între dehidrază și hidrogen. În al doilea rînd, ele sînt lipsite de oxidaze capabile să activeze oxigenul. Toxicitatea oxigenului nu ar fi datorită lui însuși, ci peroxidului la care dă naștere și care nu poate fi descompus, bacteriile anaerobe fiind lipsite de fermenții respectivi, și anume de catalaze și peroxidaze.

Aceste date ne arată deja că bacteriile, privite din punct de vedere al actului respirator, pot fi împărțite în două grupe: aerobe și anaerobe. Aerobe sînt acele bacterii care folosesc oxigenul în procesele lor respiratorii și nu se pot dispensa de el; anaerobe sînt acele bacterii care nu folosesc oxigenul; acest gaz poate fi chiar toxic pentru unele din ele. Între aceste două grupe se situează o a treia, intermediară, și anume grupa bacteriilor facultativ aerobe sau anaerobe, adică a bacteriilor care se multiplică în prezența ca și în absența oxigenului.

Examenul diverselor specii bacteriene, din punct de vedere al prezenței fermenților respiratorii și al proceselor care le asigură procurarea energiei vitale a arătat că există mai multe tipuri respiratorii și că se pot constitui cel puțin șapte grupe (Frei, 1936).

1. Prima grupă conține specii aerobe ca *Pasteurella animalium, Brucella abortus, Mycobacterium tuberculosis hominis, Bacillus anthracis, B. subtilis, B. mesenthericus, B. pyocyaneus,* precum și unele specii de ciuperci din genurile *Oidium, Achorion, Saccharomyces.* Microorganismele din această primă grupă sînt dotate cu un sistem respirator complet, asemănător celui găsit în țesuturile animale. Ele dispun, ca și acestea din urmă, de fermenți activatori și purtători de oxigen — oxidaze, citocrom, catalaze și peroxidaze — precum și de fermenți activatori și purtători de hidrogen — dehidraze. Procesul respirator se petrece după schema indicată mai înainte.

Bacteriile din această grupă pot fi obligat sau facultativ aerobe. Speciile facultativ aerobe pot folosi, în absența oxigenului, alt acceptor de hidrogen, cele obligat aerobe însă nu pot folosi alt acceptor decît oxigenul.

2. Grupa a doua conține speciile care, pe lîngă sistemul respirator al speciilor din grupa întîi, posedă pigmenți cu funcțiuni respiratorii. *Bacillus pyocyaneus* conține piocianină, iar levurile flavoproteină. Acești pigmenți, se pare, că pot fi reduși prin hidrogen în leucobaze incolore, comportîndu-se deci ca albastrul de metilen. Mecanismul intim al intervenției lor, în procesul respirator, nu este încă precizat. Se pare că acești pigmenți funcționează alături de sistemul respirator obișnuit al bacteriilor, accentuînd însă capacitatea lor consumatoare de oxigen.

Scanned with OKEN Scanner

3. Grupa a treia conține o serie de specii bacteriene, cum sînt *Staphylococcus pyogenes, Bacillus proteus, Escherichia coli, Salmonella typhi murium, Salm. paratyphi, Salm. enteritidis, Salm. suipestifer, Salm. pullorum* etc., care au citocrom, peroxidază și catalază, dar sînt lipsite de indofenoloxidaze și, unele din ele, și de cîte o variantă de citocrom. Ele au deci un sistem respirator aerob incomplet. Bacteriile din acest grup sînt, cu excepția unor tulpini de bacili ai tuberculozei, facultativ anaerobe și se multiplică în absența oxigenului, dacă dispun de un acceptor convenabil, nitrați sau acid fumaric. În aerobioză, ele utilizează oxigenul atmosferic, dar pot folosi și oxigenul eliberat de o substanță chimică reductibilă, ca de exemplu cel eliberat prin reducerea nitraților (NO_3K) în nitriți (NO_2K).

Astfel, *Escherichia coli,* anaerob facultativ, poate folosi în anaerobioză ca unic izvor de carbon, lactați, succinați, acetați sau glicerină ; aceste substanțe, suficiente în aerobioză, nu-i permit multiplicarea în anaerobioză din cauza lipsei unui acceptor convenabil. Adăugînd mediului un acceptor de hidrogen, de exemplu un nitrat, bacteria se dezvoltă. Observații similare s-au făcut și cu privire la *Proteus vulgaris ;* acizii piruvic, lactic, succinic sau fumaric, folosiți în anaerobioză, ca izvor de carbon, nu pot servi același scop în anaerobioză decît în prezența nitratului de potasiu, care îndeplinește funcția de acceptor de hidrogen.

4. Grupa a patra cuprinde germenii anaerobi facultativi ca bacilul rujetului, unele tulpini de ciuperci din genurile *Trychophiton, Aspergillus* etc., care sînt complet lipsite de citocrom, dar conțin oxidaze, peroxidaze și catalaze. Mecanismul respirator în aerobioză, nu este complet lămurit. În anaerobioză, fermenții oxidanți sînt inactivi și germenii își procură energia prin procese de oxidoreducție, folosind alți acceptori decît oxigenul.

5. Grupa a cincea cuprinde specii facultativ anaerobe ca *Streptococcus equi, Str. haemolyticus,* unele specii din genul *Actinomyces* etc., care sînt lipsite de citocrom, hematină și oxidază, dar conțin peroxidază și catalază.

6. Grupa a șasea cuprinde specii obligat anaerobe ca *Bacillus perfringens, Clostridium chauvei, Cl. oedematis maligni, Cl. tetani, Cl. botulinum* etc. Aceste specii nu conțin citocrom, oxidaze, peroxidaze și catalaze.

Singurii fermenți respiratorii ai acestor germeni sînt dehidrazele, adică activatorii și purtătorii de hidrogen. Aceste bacterii folosesc alți acceptori de hidrogen decît oxigenul. Este de semnalat însă că o specie nu poate folosi la întîmplare orice donator și orice acceptor, ci numai unul din ei și anume pe cel pentru care are fermenții necesari.

7. Grupa a șaptea cuprinde o specie obligat anaerobă, *Clostridium butiricum* și una facultativ anaerobă, *Lactobacillus delbrückii.* Ambele sînt lipsite de fermenți oxidanți, dar conțin fermentul galben (flavina). Acest pigment este lipsit de fier și, în consecință, nu este inhibat de oxidul de carbon sau de acidul cianhidric. Flavina împreună cu o coenzimă îndeplinesc funcțiuni de transportori de hidrogen :

$$\text{donator} - H_2 + \text{coenzimă} = \text{coenzimă} - H_2 + \text{donator}$$
$$\text{coenzimă} - H_2 + \text{flavină} = \text{flavină} - H_2 \text{ coenzimă}$$
$$\text{flavină} - H_2 + O = \text{flavină} + H_2O$$

In absența oxigenului, hidrogenul transportat de flavină este cuplat cu un alt acceptor.

Scanned with OKEN Scanner

Această clasificare a bacteriilor, după sistemul respirator pe care-l posedă, nu este definitivă, ci numai ca o ipoteză de lucru.

Pe măsură ce cercetările, în această privinţă, vor progresa, în aceeaşi măsură se vor descoperi noi substanţe cu funcţiuni respiratorii, şi deci noi grupe respiratorii. Deja se pare că prezenţa glutationului şi a acidului ascorbic în celulele unor specii bacteriene este în legătură cu sisteme respiratorii deosebite de cele de mai sus.

NUTRIŢIA BACTERIANĂ

TIPURI NUTRITIVE

În constituţia chimică a celulei bacteriene intră o serie de elemente ca N, H, O, Na, K, Ca, şi P etc. C, H, N şi O se găsesc în cantităţi mai mari. Elementele celelalte se găsesc în cantităţi mai reduse, aşa cum reiese din analizele chimice. Astfel, cenuşa, adică partea minerală a celulei, reprezintă, la bacilul difteriei, de exemplu, doar 4,6%, în timp ce C singur ocupă 48,9% din greutatea uscată, iar azotul 11,2%. Aceste proporţii le găsim, de altfel, la toate vieţuitoarele

Celula bacteriană, pentru a se divide, are nevoie de toate elementele care o constituie şi pe care trebuie să le găsească în mediu. Unele elemente, cum sînt cele care formează partea minerală a celulei, sînt mai uşor de procurat, întîi pentru că ele sînt foarte răspîndite în natură, în al doilea rînd pentru că necesităţile celulare sînt reduse. Procurarea de H şi O nu constituie, la fel, o problemă, dat fiind enorma lor răspîndire în natură.

Bacteriile, ca şi alte vieţuitoare de altfel, întîmpină, desigur, dificultăţi în găsirea compuşilor azotului şi carbonului, deoarece, pe de o parte, aceşti compuşi, sub forme asimilabile, sînt mai puţin răspîndiţi în natură, iar, pe de altă parte, necesităţile materiei vii în C şi în N sînt foarte mari. În general, se poate spune că răspîndirea acestor compuşi condiţionează, în mod direct, răspîndirea vieţuitoarelor, mai ales a unora dintre ele.

Plantele verzi îşi procură azotul şi carbonul din compuşii anorganici ai acestor două elemente respectiv şi, în special, din nitraţi şi CO_2, iar animalele din compuşii organici. Bacteriile ocupă o poziţie intermediară între cele două regnuri şi anume unele specii se comportă ca plantele verzi, altele ca animalele.

Privite din acest punct de vedere, bacteriile au fost împărţite în două grupe şi anume:

1. Bacterii autotrofe, care se comportă ca plantele verzi.
2. Bacterii heterotrofe, care se comportă ca animalele şi plantele fără clorofilă (ciuperci).

Bacteriile autotrofe îşi sprijină întregul lor metabolism pe lumea anorganică; metabolismul lor poate fi considerat autonom, independent, deoarece nu este legat de existenţa altor vieţuitoare. Dimpotrivă, heterotrofele, avînd nevoie de principii organice, sînt legate de existenţa altor vieţuitoare de la care ele îşi procură unele substanţe nutritive.

Filogenetic, bacteriile, şi în general vieţuitoarele autotrofe, este probabil că au precedat heterotrofelor, a căror existenţă este condiţionată de aceea a autotrofelor.

Scanned with OKEN Scanner

Unii cercetători au mai creat un tip nutritiv de bacterii şi anume al *prototrofelor,* tip care cuprinde speciile ce pot folosi ca izvoare plastice sau energetice unele elemente cum sînt N, H, S. Unele prototrofe sînt heterotrofe, cum sînt bacteriile care fixează azotul atmosferic, iar altele, cum sînt bacteriile care oxidează sulful elementar în sulfat, sînt autotrofe.

AZOTUL ŞI COMPUŞII SĂI CA IZVOARE PLASTICE ŞI ENERGETICE

În constituţia chimică a bacteriilor se găsesc cantităţi importante de protide, adică substanţe chimice care conţin ca element de bază azotul. În consecinţă, sinteza acestor substanţe nu se poate face decît plecînd de la azot sau compuşii săi. Azotul este deci un element plastic de primă importanţă, dar, în acelaşi timp, el şi compuşii săi pot servi şi ca izvoare de energie. Unele bacterii pot folosi pentru sinteza materiei azotate, azotul din atmosferă, altele nu-şi pot lua azotul decît din multiplii complecşi, anorganici sau organici, pe care acest element îi formează şi care se găsesc în natură.

AZOTUL ATMOSFERIC

Unele specii bacteriene, spre deosebire de enorma majoritate a vieţuitoarelor, pot cupla azotul liber din atmosferă cu hidrogenul, dînd amoniacul şi îmbogăţind, astfel, solul în compuşi azotaţi asimilabili de către plante şi animale.

Fără intervenţia acestor bacterii, azotul atmosferic ar rămîne în afara circuitului materiei vii, deoarece, pe de o parte, el nu poate fi folosit, ca atare, de cea mai mare parte dintre vieţuitoare, iar, pe de altă parte, în afara materiei vii, el nu se combină decît în proporţii neînsemnate cu alte elemente. Singure descărcările electrice produc cantităţi reduse de oxizi de azot, combinaţii care pot intra în diverse reacţii chimice sau biologice.

Originea biologică a cuplării azotului cu hidrogenul a fost întrevăzută de Pasteur (1862) şi demonstrată de Berthelot în 1885.

Acest din urmă cercetător a demonstrat că în probele de sol nesterile şi puse în afara posibilităţii pătrunderii compuşilor azotaţi, conţinutul lor în azot totuşi creşte de la o determinare la alta (0,0705 g de azot pe 1 kg în mai 1884, 0,1105 g de azot pe 1 kg în octombrie 1885), în timp ce în aceleaşi probe, sterilizate la 120°C, conţinutul în azot rămîne acelaş. Natura biologică a fenomenului era astfel demonstrată. Urma să se determine agenţii animaţi care produceau îmbogăţirea solului în azot, ceea ce a fost făcut de Vinogradski (1895) şi Beijerink (1901). Aceşti cercetători au izolat specii bacteriene capabile să se multiplice în medii lipsite de azot ca o consecinţă a capacităţii lor de a fixa azotul atmosferic. Fixarea azotului a putut fi, în plus, demonstrată şi prin analiza aerului dintr-un spaţiu ermetic închis în care se dezvoltă asemenea bacterii.

Mediul folosit de cercetători, pentru a izola specii fixatoare de azot, era uşor alcalin şi avea următoarea compoziţie:

PO_4K_2H	0,5 g
manită	20 g
apă de robinet	1 000 ml

Astfel constituit, mediul este electiv, în sensul că în el nu se pot multiplica, ca o consecinţă a lipsei oricărui complex azotat, decît bacterii care asimilează azotul din atmosferă, care îşi pot deci sintetiza proteinele complexe, plecînd de la azotul gazos şi unii compuşi hidrocarbonaţi simpli.

Existenţa acestor bacterii în natură, apă sau pămînt, în medii în care concurenţa vitală este enormă, se datoreşte tocmai capacităţii lor de a fixa azotul liber şi de a folosi, ca izvoare energetice produşi ternari simpli ca: etanolul, butanolul, sărurile unor acizi organici etc. care sînt foarte răspîndiţi în natură şi care nu sînt folosiţi de alte specii bacteriene. Ele se multiplică deci în condiţii şi în medii în care multiplicarea altor bacterii este imposibilă.

Bacteriile asimilatoare de azot liber pot fi împărţite în două grupe: unele asimilează singure azotul, altele în simbioză cu unele plante superioare, în special cu leguminoasele.

SPECII CARE ASIMILEAZĂ SINGURE AZOTUL

Speciile din această grupă sînt anaerobe (*Clostridium pastorianum*) sau aerobe (genul *Azotobacter* cu speciile *A. chroococcum, A. indicum, A. agile* etc.). Se dezvoltă în medii lipsite de azot, însă au nevoie de o sursă organică de carbon (glucoză, manită, alcool etilic, alcool butilic, acizi propionic, butilic, acetic sau benzoic), precum şi de prezenţa unor săruri de Ca, K sau Na. *Clostridium pastorianum,* în plus poate hidroliza şi unele poliozide ca hemiceluloza şi-le poate deci folosi ca izvor de carbon. Unele specii aerobe din genul *Azotobacter* se pot dezvolta în simbioză cu germeni capabili să dezintegreze celuloza şi care le pun la dispoziţie produşi ternari asimilabili.

Energia rezultată din dehidrogenarea substanţei hidrocarbonate este folosită la sinteza amoniacului din azotul liber şi hidrogenul eliberat, catalitic, de substanţa ternară [1]. Cantitatea de azot fixată este direct proporţională cu cantitatea de zahăr consumată. Fixarea azotului, de către speciile aerobe, se face, în condiţii optime, la un pH uşor alcalin, la o concentraţie de 10—15% oxigen şi în prezenţa unor elemente ca stronţiul, molibdenul, calciul, vanadiul şi fierul. Bacteriile din această grupă pierd proprietatea de a fixa azotul cînd sînt cultivate pe medii bogate în compuşi azotaţi, dar şi-o recapătă cînd sînt din nou trecute pe medii fără azot. Bacteriile fixatoare de azot se găsesc în mucilagiile de pe suprafaţa apelor, în pămînturile cultivate şi bogate în săruri de calciu şi fosfaţi; sînt mai rare în pămînturile virgine şi în cele situate la altitudini mari. Un pămînt sărac în asemenea specii se poate îmbogăţi, adăugîndu-i var şi fosfaţi, substanţe care le favorizează multiplicarea.

[1] Se admitea, pînă la importantele lucrări ale lui Vinogradski (1932, 1941), că bacteriile sintetizează, din azotul liber şi hidrogen, amoniacul necesar sintezelor celulare şi că amoniacul astfel sintetizat nu se pune în libertate decît după moartea celulei. Cercetările acestui savant (1941) au arătat că bacteriile din genul *Azotobacter* sintetizează mai mult amoniac decît le este necesar. Această sinteză se realizează printr-un ferment numit azohydrază, care îşi continuă activitatea sintetică mult timp după moartea celulei. Producerea de amoniac se realizează deci în timpul multiplicării celulelor ca şi după moartea acestora. Sub acţiunea acestor bacterii se produce o îmbibare a mediului din jurul lor, adică a pămîntului, cu amoniac şi săruri amoniacale.

Scanned with OKEN Scanner

SPECII CARE ASIMILEAZĂ AZOTUL IN SIMBIOZA CU PLANTELE SUPERIOARE

Aceste bacterii sînt aerobe, Gram negative şi heterotrofe. Fac parte din genul *Rhizobium*, care conţine mai multe specii ca: *R. leguminosarum, R. phaseoli* etc. Se găsesc în nodozităţile de pe rădăcinile diferitelor leguminoase. Natura bacteriană a acestor nodozităţi şi funcţiunile fixatoare de azot ale bacteriilor care se găsesc în ele au fost demonstrate de Hellriegel şi Wilfart în 1888. Autorii au arătat că leguminoasele, cultivate în pămînt steril şi udate cu apă sterilă, nu prezintă asemenea nodozităţi şi nu îmbogăţesc pămîntul în principii azotaţi. Dimpotrivă, nodulii apar şi concentraţia compuşilor azotaţi în pămînt creşte cînd aceleaşi leguminoase sînt udate cu apă nesterilă.

Mai tîrziu s-a putut izola din nodulii de pe rădăcinile leguminoaselor o primă specie bacteriană cu ajutorul căreia s-au putut provoca, în mod experimental, noduli pe rădăcinile leguminoaselor; mediul de izolare folosit constă dintr-o decocţie de frunze de leguminoase la care s-a adăugat 0,25% asparagină şi 0,25% zahăr.

OXIDAREA AMONIACULUI IN NITRIŢI ŞI A NITRIŢILOR IN NITRAŢI

După ce Pasteur, în 1862, a arătat că oxidarea alcoolului în acid acetic este datorită unei vieţuitoare, Schlessing şi Müntz, în 1872, demonstrează de asemenea că oxidarea amoniacului şi a nitriţilor sînt fenomene tot de origine biologică. Intr-adevăr, asemenea procese nu se petrec în pămînturi sterilizate prin căldură sau antiseptice.

Agenţii oxidanţi ai amoniacului au fost izolaţi de Vinogradski, în 1891, cu ajutorul mediilor semilichide. Vinogradski arată că un grup de germeni — speciile din genul *Nitrosomonas* — oxidează amoniacul în nitriţi, iar alt grup — speciile din genul *Nitrobacter* — nitriţii în nitraţi. Cele două procese oxidante se petrec succesiv, în sensul că oxidarea nitriţilor în nitraţi nu se face decît după ce tot amoniacul a fost oxidat în nitriţi.

Germenii de genul *Nitrosomonas* ca şi cei din genul *Nitrobacter* sînt strict autotrofi, căci ei nu folosesc şi nu pot folosi substanţe organice; mai mult încă, aceste substanţe — glucoza, asparagina etc. — au chiar un efect inhibitor asupra multiplicării. Energia necesară sintezelor celulare este obţinută exclusiv din oxidarea amoniacului sau a nitriţilor, conform ecuaţiilor.

$$2\ NH_3 + 3\ O_2 = 2\ NO_2H + 2H_2O + 79\,000 \text{ calorii}$$
$$2\ NO_2H + O_2 = 2\ NO_3H + 21\,000 \text{ calorii}$$

Aceste bacterii folosesc, ca izvor de carbon, CO_2 care, se pare, este redus cu ajutorul energiei rezultate din oxidarea amoniacului sau nitriţilor în formaldehidă sau acetaldehidă. Aminoacizii sînt sintetizaţi, de aceste bacterii, din formaldehidă şi amoniac printr-un proces asemănător celui descris la plante.

FOLOSIREA ALTOR IZVOARE ANORGANICE DE AZOT

Bacteriile, pe lîngă amoniac, nitriţi şi nitraţi, pot utiliza şi alţi compuşi anorganici ai azotului şi în primul rînd sărurile de amoniu. O serie de medii sintetice, întrebuinţate pentru cultivarea unei specii patogene, au ca sursă de azot o sare amoniacală, sulfaţi sau fosfaţi de amoniu.

Scanned with OKEN Scanner

FOLOSIREA SUBSTANȚELOR AZOTATE ORGANICE

Bacteriile heterotrofe pot folosi, ca elemente plastice și energetice, proteinele sau produșii rezultați din dezintegrarea acestor molecule — polipeptide, aminoacizi etc. Bacteriile patogene sînt, în general, puțin active față de moleculele proteice și folosesc, în nutriția lor, de preferință peptonele și aminoacizii. Unii cercetători au observat, în acest sens, că bacterii proteolitice ca *Proteus vulgaris, Bacillus pyocyaneus* etc. nu se dezvoltă în medii care conțin, ca unic izvor de azot, numai mari molecule proteice, ca albumina serică, albumina de ou cristalizată etc. În aceste condiții, germenii nu se multiplică și nu atacă proteina ; substanța poate fi însă dezintegrată, dacă, pe lîngă proteină, se mai adaugă mediului și o altă sursă de azot, gelatină impură sau peptone. Această incapacitatea a germenilor, reputați ca proteolitici, de a dezintegra și folosi marile molecule proteice se pare că se datorește absenței în concentrații convenabile a fermenților respectivi. O asemenea concentrație în fermenți se realizează și proteoliza devine posibilă cînd în mediu, așa cum s-a văzut mai sus, se găsesc compuși azotați mai simpli și deci accesibili fermenților celulari preexistenți (constitutivi).

FERMENȚII PROTEOLITICI. PRODUȘII FINALI DE DEZINTEGRARE A PROTEINELOR

Bacteriile proteolitice dispun, în scopul dezintegrării proteinelor, de două categorii de enzime (proteaze) : unele exogene, difuzibile, altele endogene și nedifuzibile.

Proteazele bacteriene se apropie, ca mod de acțiune, de pepsina și tripsina animală, precum și de enzima respectivă izolată din drojdia de bere. Ele dezintegrează marile molecule proteice în afara celulei, transformîndu-le în produși absorbabili — aminoacizi și amoniac. Activitatea proteolitică este mai însemnată la bacteriile care conțin citocrom, decît la cele care nu conțin acest ferment.

Dezintegrarea materiei proteice din cadavre este realizată de mai multe specii bacteriene, aerobe sau anaerobe. În anaerobioză, produșii finali sînt numeroși și variați, identificîndu-se bioxid de carbon, amoniac, hidrogen sulfurat, mercaptan, acid acetic, acid butiric, acid valerianic, acid palmitic, acid lactic, aminoacizi, indol, scatol, peptone etc. În aerobioză moleculele proteice sînt descompuse în produși finali simpli, ca CO_2, NH_3, N_2, H_2 și apă.

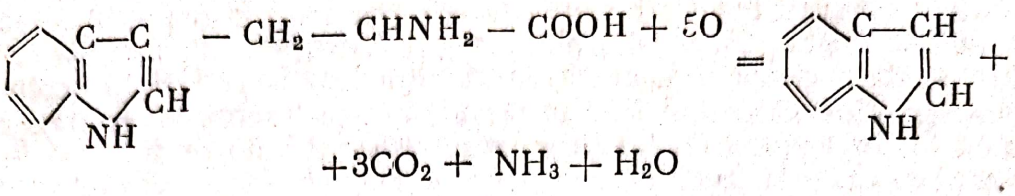
Aminoacizii pot fi pentru bacterii izvoare de azot și de carbon și pot servi scopuri plastice și energetice. Bacteriile posedă enzime care dezintegrează, în variate feluri, molecula diverșilor aminoacizi.

Bacteriile care dezintegrează aminoacizii produc *amoniac ;* acest produs de descompunere este, în metabolismul bacterian, ceea ce este ureea în metabolismul animal. Alături de amoniac mai pot lua naștere, în cursul aceluiași proces, și alți complecși ca : indol, fenol, scatol, hidrogen sulfurat, bioxid de carbon, hidrogen molecular etc.

Indolul rezultă din descompunerea triptofanului de către enzimele unor specii bacteriene cum sînt colibacilul, pasteurelele etc. Fermentul capabil să opereze această descompunere a fost izolat și numit triptofanază. Acțiunea

Scanned with OKEN Scanner

sa dezintegrantă constă din oxidarea lanţului lateral al triptofanului conform ecuaţiei :



$$+ 3CO_2 + NH_3 + H_2O$$

Triptofanaza nu se secretă în mediile care conţin zaharuri fermentescibile. Colibacilul, de exemplu, nu produce indol în mediile cu glucoză, decît după ce tot zahărul a fost descompus.

Fenolul rezultă din oxidarea tirozinei ; *Escherichia coli*, în medii conţinînd lactat de amoniu, asparagină şi săruri minerale, produce fenol pe socoteala acestui aminoacid.

Scatolul este produs de o singură specie : *Clostridium scatole*.

Hidrogenul sulfurat rezultă din descompunerea aminoacizilor care conţin sulf — cisteina şi cistina.

Acidul nucleic poate fi descompus de fermenţii unor specii bacteriene. Unii cercetători au dovedit, de exemplu, că o suspensie de *Bacillus subtilis* descompune, la pH =6,8, 80% dintr-o soluţie 3% de acid zimonucleic, extras din drojdia de bere. Acest acid organic este compus din : acid fosforic, baze pirimidinice, baze purinice şi zahăr. Fermenţii bacterieni separă nucleotidele din acidul nucleic şi pe aceştia îi poate descompune mai departe, fie în cele trei componente (bază, pentoză, acid fosforic), fie în complecşi : pentoză — acid fosforic sau bază — pentoză (nucleozid). Substanţele constituente pot fi, la rîndul lor, dezintegrate şi s-a demonstrat că suspensiile spălate de *Escherichia coli* dezaminează adenina, adenozina, acidul adenilic, acidul guanilic etc.

SINTEZA SUBSTANŢELOR PROTEICE

Autotrofele se multiplică în medii lipsite de compuşi organici şi îşi pot sintetiza moleculele proteice din săruri de amoniu şi bioxid de carbon. Unele specii heterotrofe îşi pot satisface complet nevoile de azot prin sărurile de amoniu, dacă au la dispoziţie un produs ternar organic, glicerina de exemplu. Aceste bacterii au un aparat enzimatic complex care le permite să sintetizeze din amoniac şi un compus al carbonului toţi complecşii azotaţi. Nu toate bacteriile au asemenea posibilităţi. Astfel, există bacterii care, în absenţa enzimei respective, nu pot sintetiza un aminoacid şi care nu se pot multiplica decît într-un mediu care conţine acest aminoacid. În acest sens s-a constatat că *Salmonella thyphosa* nu poate sintetiza triptofanul, aminoacid de care are absolută nevoie şi în absenţa căruia nu se multiplică. La fel, s-a dovedit că din 25 de tulpini de stafilococ cercetate, patru nu puteau sintetiza triptofanul şi aveau deci nevoie de acest aminoacid. Triptofanul este pentru bacterii ca şi pentru animale un aminoacid de o deosebită importanţă.

CARBONUL ŞI COMPUŞII SĂI CA IZVOARE PLASTICE ŞI ENERGETICE

Celula bacteriană conţine cantităţi importante de carbon, pe care şi-l poate procura din cei mai variaţi compuşi a acestui element, dar nu din carbonul elementar.

Autotrofele iau carbonul din oxidul de carbon, acidul carbonic sau carbonaţi, heterotrofele din cei mai variaţi compuşi organici ca metanul, benzina, parafina, fenolul, acizii organizi, alcoolii, polialcoolii, zaharurile, grăsimile etc. Compuşii cuaternari cum sînt aminoacizii pot, la fel, constitui, pentru unele bacterii, pe lîngă un izvor de azot şi unul de carbon. S-a studiat, în această privinţă, specia *Pseudomonas aminovorans,* care îşi procură carbonul dintr-o serie de acizi aminaţi. Dăm cîteva exemple cu privire la modul cum sînt folosiţi diverşii compuşi ai carbonului de către unele bacterii.

Oxidarea oxidului de carbon. S-a izolat, din pămînt, o specie bacteriană autotrofă, *Bacillus oligocarbophilus,* care îşi procură energia oxidînd oxidul de carbon în bioxid de carbon, conform ecuaţiei :

$$CO + \frac{1}{2} O_2 = CO_2 + 74\,000 \text{ calorii}$$

Bacteria este autotrofă şi se multiplică pe medii sintetice care conţin, ca izvor de azot, săruri amoniacale, nitriţi sau nitraţi.

Oxidarea metanului. S-a izolat, tot din pămînt, o specie bacteriană, *Bacillus methanicus,* capabilă să oxideze metanul, conform cu ecuaţia :

$$CH_4 + 2O_2 = CO_2 + 2H_2O + 195\,000 \text{ calorii}$$

Se dezvoltă în medii sintetice anorganice şi într-o atmosferă compusă din 1/3 metan şi 2/3 aer.

Utilizarea altor compuşi ai carbonului. Bacteriile folosesc, pe o scară întinsă diverşi compuşi organici ai carbonului. Capacitatea de a folosi aceşti compuşi este, pentru unele specii, redusă, pentru altele dimpotrivă, ea este foarte mare. Folosindu-se medii sintetice în care singurul izvor de azot erau sărurile amoniacale, s-a constatat, de exemplu, că *Micrococcus albus* a descompus cîţiva, în timp ce *Pseudomonas putida* a atacat 77 din cei 200 de compuşi ai carbonului care au fost cercetaţi.

Bacteriile patogene descompun şi folosesc frecvent, drept aliment, hexozele şi polialcoolii mai rar acizii organici ca acidul lactic, acidul citric, acidul succinic, acizii graşi sau alcoolii monohidrici. Polizaharidele pot constitui pentru bacterii o sursă plastică şi energetică. *Bacillus subtilis, B. anthracis, Escherichia coli, Clostridium welchii* etc. fermentează de exemplu, amidonul. Celuloza este accesibilă fermenţilor unor specii bacteriene saprofite, aerobe sau anaerobe, care se găsesc în conţinutul gastrointestinal al ierbivorelor, în special al bovideelor.

Fermentarea zaharurilor, polialcoolilor şi alcoolilor prezintă o deosebită importanţă economică. Transformarea zaharurilor în alcooli, a alcoolului în acid acetic, a lactozei în acid lactic etc. sînt procese fermentative folosite în industria alimentară. Procesele fermentative, avînd un grad însemnat de specificitate, pot fi folosite în diagnosticul diferenţial al speciilor. Intr-adevăr, capacitatea de a ataca o substanţă este, în linii generale, con-

stantă pentru speciile bacteriene. Produşii de dezintegrare a substanţelor ternare sînt multipli. Uneori însă unul din aceşti produşi este dominant şi caracterizează procesul fermentativ. Astfel, din descompunerea zahărului de către levuri rezultă mai mulţi produşi din care însă alcoolul etilic este dominant; în fermentaţia alcoolului de către *Bacterium aceti* produsul dominant final, este acidul acetic ; în alte procese sînt alţi produşi dominanţi ca acidul butiric, acidul propionic, acetona etc. De aici numele de fermentaţie alcoolică, acetică, butirică, propionică etc. La unele bacterii, procesul de descompunere a zaharurilor este mai complicat şi produşii finali sînt mai numeroşi şi mai variaţi, nici unul din ei nefiind dominant. Iată, de exemplu, produşii rezultaţi din descompunerea cîtorva compuşi ai carbonului de către *Escherichia coli.*

Tabelul 13

Produşii rezultaţi din descompunerea cîtorva compuşi ai carbonului de către *Escherichia coli*

Produşi rezultaţi din descompunerea cîtorva compuşi ai carbonului în procente	Compuşi ai carbonului				
	Manită	Glucoză	Acid gluconic	Acid glicuronic	Acid zaharic
Acid lactic	24,4	44,6	15,1	17,5	5,8
Acid succinic	6,9	5,0	9,6	14,6	15,5
Acid acetic	7,0	16,8	23,4	48,2	49,1
Acid formic	7,4	0,8	0,5	0,6	2,5
CO_2	27,3	12,4	13,8	5,0	22,0
Alcool etilic	27,0	16,1	10,8	2,6	1,0
	100	95,7	73,2	88,5	95,9

Fermentaţia compuşilor carbonului duce la formarea diverşilor acizi şi la acidifierea mediilor în care se dezvoltă aceste bacterii. În mod practic, acidifierea mediului constituie o dovadă că zahărul conţinut a fost dezintegrat. Pentru a pune în evidenţă producerea de acid şi deci pentru a dovedi că substanţa de examinat a fost fermentată în mod obişnuit se adaugă mediului un indicator care îşi schimbă culoarea în raport cu gradul de ionizare sau se titrează aciditatea mediului după dezvoltarea bacteriei. Aceste procedee pot da naştere la erori care sînt datorite următoarelor cauze principale :

1. acizii rezultaţi din descompunerea zahărului sau altei substanţe sînt în cantitate prea mică şi nu pot schimba culoarea mediului, adică nu pot face virajul indicatorului ;

2. zahărul este descompus fără producere de acizi ;

3. zahărul este descompus, iau naştere acizi, însă aceştia sînt neutralizaţi de substanţele tampon din mediu ;

4. zahărul este descompus, iau naştere acizi, însă aceştia sînt neutralizaţi de alcalii care se produc în mediu prin descompunerea, de către alţi fermenţi, a altor substanţe, în general protide.

Metoda cea mai bună pentru a dovedi că o substanţă hidrocarbonată a fost fermentată de o specie bacteriană constă din titrarea ei înainte de însămînţare şi după dezvoltarea bacteriilor în mediu.

Scanned with OKEN Scanner

Pe lîngă acizi, pot lua naştere, în cursul acestor fermentaţii, şi gaze, ceea ce dovedeşte că procesul fermentativ a mers pînă la ultimul termen. Gazele sînt constituite de CO_2 şi H_2 [1] şi rezultă din desfacerea acidului formic sau formiaţilor conform ecuaţiilor :

$$HCOOH + X = XH_2 + CO_2 \text{ (X acceptor de hidrogen) sau}$$
$$(COOH)_2 Ca + H_2O = CO_3 Ca + CO_2 + 2H_2$$

Desfacerea acidului formic se poate face prin intermediul unei dehidrogenaze, iar cuplarea hidrogenului cu acceptorul printr-o hidrogeneză. Se afirmă însă, de unii cercetători, că descompunerea acidului formic este un fenomen reversibil, operîndu-se după ecuaţia :

$$HCOOH \rightleftarrows H_2 + CO_2$$

şi fiind provocat de hidrogenilaza formică.

ALTE IZVOARE PLASTICE SAU ENERGETICE

Grăsimile nu pot fi folosite ca aliment de unele bacterii, deoarece acestea sînt lipsite de fermenţii necesari desintegrării lipidice. Mai mult încă, prezenţa grăsimilor poate avea, pentru unele specii, chiar un efect inhibator. Există însă bacterii care folosesc diverşi reprezentanţi ai acestei grupe chimice. Lecitina, de exemplu favorizează creşterea bacililor tuberculozei, difteriei şi cărbunelui. Grăsimea din lapte este folosită şi descompusă, cu producţie de acizi graşi şi săpun, de unii anaerobi patogeni ca *Bacillus perfringens* şi *B. oedematis maligni*. Unii germeni lipolitici din unt pot produce rîncezirea acestui aliment.

OXIDAREA UNOR ELEMENTE SAU COMPUŞI MINERALI DE CĂTRE AUTOTROFE

Autotrofele obţin energia necesară prin oxidarea diverşilor compuşi minerali. Ne-am ocupat deja de bacteriile autotrofe care folosesc, ca aliment energetic, amoniacul sau nitriţii pe care îi oxidează, respectiv, în nitriţi şi nitraţi, precum şi de cele ce folosesc oxidul de carbon pe care îl oxidează în bioxid de carbon etc. Ne vom ocupa de alte procese asemănătoare.

Oxidarea hidrogenului. S-a izolat, în 1906, o tulpină bacteriană, *Bacillus pantothropus,* şi mai tîrziu, alte tulpini, diferite morfologic, care se dezvoltă, fie pe medii sintetice compuse din PO_4H_2K, SO_4Mg, $ClNH_4$, CO_3NaH, Cl_3Fe şi într-o atmosferă care conţine CO_2 şi H_2, fie pe medii obişnuit folosite pentru heterotrofe. În stare autotrofă, *B. pantothropus* foloseşte ca sursă de azot sărurile amoniacale, ca sursă de carbon CO_2, iar energia o obţine oxidînd hidrogenul după ecuaţia :

$$H_2 + {}^1/_2\, O_2 = H_2O + 56\,000 \text{ calorii}$$

[1] In culturile bacteriene, ca şi în ţesuturile infectate cu anaerobi, pot lua naştere şi alte gaze ca N, CH_4, NH_3, SH_2.

CO_2 nu rezultă numai din descompunerea hidraţilor de carbon, ci şi din desfacerea aminoacizilor.

Scanned with OKEN Scanner

Oxidarea sulfului sau compușilor săi este realizată de numeroase specii bacteriene care se găsesc în pămînt sau apele sulfuroase și care se numesc și bacteriile sulfului.

Oxidarea compușilor fierului. Există bacterii numite și bacteriile fierului, care provoacă reacții exotermice pe socoteala compușilor fierului. O asemenea specie — *Spirophilum ferugineum* — se multiplică bine la 0°C, foarte bine la 6°C, bine la 15°C, slab la 22°C și de loc la 27°C; este autotrofă strictă; peptona, aminoacizii, zaharurile ca și alți compuși organici au un efect net inhibitor; nu se dezvoltă în absența CO_3Fe și a CO_2. Oxidarea carbonatului de fier se face după ecuația:

$$4CO_3Fe + O_2 + 6H_2O = 4\ Fe\ (OH)_3 + 4CO_2 + 81\ 000 \text{ calorii}$$

Leptotrix ochraceae — o altă specie oxidantă a compușilor fierului — a fost cercetată de Vinogradski; pentru această specie, compușii fierului pot fi înlocuiți cu cei ai manganului.

FOLOSIREA ENERGIEI LUMINOASE PROCESE DE FOTOSINTEZA LA BACTERII

Unele specii bacteriene care trăiesc în apele luminate pot folosi energia luminoasă datorită prezenței unui pigment asemănător clorofilei. Aceste bacterii reduc, ca și plantele verzi, CO_2 în aldehidă formică; ele nu folosesc însă ca agent reductor și eliberator de hidrogen, apa ($CO_2 + H_2O = HCHO + O_2$), ci fie sulfatul liber, fie hidrogenul sulfurat, fie unii acizi organici. Bacteriile care conțin granule de sulf oxidează sulful liber după ecuația:

$$3CO_2 + 2S + 8\ H_2O = 3HCHO + 3\ H_2O + 2SO_4H_2$$

iar cele care nu conțin granule de sulf oxidează hidrogenul sulfurat, hidrogenul sau acizii organici conform ecuațiilor:

$$CO_2 + 2\ SH_2 = HCHO + H_2O + 2\ S$$
$$CO_2 + 2\ H_2 = HCHO + H_2O$$
$$CO_2 + C_4H_8O_3 + H_2 = 5\ HCHO$$

Există, așa cum se vede în ecuațiile de mai sus, bacterii care pun sulf în libertate și se afirmă că depozitele de sulf din sol ar putea avea și o origine biologică.

ALȚI COMPLECȘI CHIMICI NECESARI MULTIPLICĂRII BACTERIILOR

Vitaminele sau factorii de creștere. Animalele, pe lîngă substanțele nutritive care sînt folosite în scopuri plastice și energetice, au nevoie și de materii care nu intră propriu-zis în metabolismul organic, dar, în absența cărora se produc o serie de stări patologice. Această concluzie a fost trasă din observația făcută de mult timp asupra oamenilor hrăniți pe vapoare exclusiv cu alimente fierte, conserve. Alimentele folosite corespundeau unor

Scanned with OKEN Scanner

rații complete și totuși oamenii se îmbolnăveau de scorbut. Cercetările experimentale făcute, în primul rînd, de L u n i n, în Rusia (1881), au arătat că îmbolnăvirea este datorită lipsei unor substanțe alimentare care se găsesc în lapte.

Plecîndu-se de la lucrările lui L u n i n, s-au identificat apoi o serie întreagă de substanțe necesare funcționării organismului uman sau animal. Plantele verzi, fiind dotate cu un echipament enzimatic mult mai complex și deci cu o capacitate de sinteză mult mai mare, sînt mai puțin expuse carențelor alimentare. În schimb, bacteriile, mai ales cele heterotrofe, au nevoie, în dezvoltarea lor, de anumiți complecși chimici. Primele observații, privind necesitatea unor asemenea complecși, au fost făcute de W i l d i e r s, în 1901. Acest cercetător a constatat că *Saccharomyces cerevisiae* (drojdia de bere) nu se multiplică într-un mediu sintetic decît dacă este abundent însămînțată, ceea ce înseamnă că o cantitate mare de cultură aduce cu ea, în mediul sintetic, factori indispensabili dezvoltării. Acești factori au fost numiți de autor *„bios"* și ei îndeplinesc, pentru microorganisme, aceleași funcțiuni ca și vitaminele pentru animale. Cercetarea diverselor specii microbiene, cu privire la necesitățile lor metabolice, a arătat că o serie întreagă de specii, pentru a se multiplica, au nevoie de anumiți complecși chimici, care au fost numiți factori de creștere (L w o f f, 1938). Ei îndeplinesc pentru bacterii aceleași funcțiuni pe care le au vitaminele pentru animalele superioare. Se cunosc astăzi numeroși factori de creștere. Hematina, de exemplu, este necesară pentru germenii din genul *Hemophilus,* cum sînt speciile *H. influenzae, H. suis, H. canis, H. ducrey.* La fel, acidul nicotinic sau vitamina PP (nicotinamida) este indispensabilă pentru *Staphylococcus aureus* și unele variante de bacilii dizenteriei, aneurina (vitamina B_1) pentru *Staphylococcus aureus* și bacteriile propionice, acidul pimelic pentru unele tulpini de bacilii difteriei, lactoflavina (vitamina B_2) pentru unele bacterii care se cultivă în lapte etc. Uracilul, component al acidului nucleic, este, în anaerobioză, un factor de creștere pentru *Staphylococcus aureus :* el nu mai este însă în aerobioză, deoarece bacteria sintetizează, în prezența oxigenului liber, această substanță. *Hemophilus influenzae* sintetizează hematina în anaerobioză, dar nu în aerobioză ; în aerobioză, deci, hematina este pentru acest germen un factor de creștere, *H. influenzae* are însă nevoie atît în aerobioză cît și anaerobioză de factorul V care este o fosfopiridino-nucleotidă, compusă dintr-o bază purinică (adenina), două molecule de pentoză, două sau trei molecule de acid fosforic și din amida acidului nicotinic.

Unele bacterii, cultivate în asociație, își pot suplini deficiențele de sinteză constituind adevărate simbioze. Astfel, nici *H. canis* și nici *H. parainfluenzae* nu se dezvoltă în cultură pură, în apă peptonată ; însămînțați împreună, ei însă se multiplică sintetizînd unul pentru altul factorii de creștere de care fiecare specie are nevoie. Cercetările experimentale au dovedit, într-adevăr, că *H. canis* are nevoie de hematină, dar sintetizează factorul V, în timp ce *H. parainfluenzae* are nevoie de factorul V, dar sintetizează hematina numită și factorul X.

Un caz similar prezintă bacilul paratuberculozei bovideelor, care nu se dezvoltă decît în medii în care s-au adăugat fie bacilii tuberculozei umane omorîți, fie tuberculină. Bacilii tuberculozei conțin deci un factor indispensabil metabolismului bacilului paratuberculozei. Acest factor se găsește însă și în alte substraturi.

Scanned with OKEN Scanner

Constatarea că vitaminele necesare organismelor animale, cum sînt aneurina, flavina etc., constituie factori de creştere indispensabili pentru unele bacterii, a fost folosită în descoperirea prezenţei acestor vitamine şi dozarea lor în diverse alimente sau preparate farmaceutice. Alimentul sau preparatul va conţine vitamina B_2, de exemplu, cînd, adăugat unui mediu sintetic, el va permite dezvoltarea unei specii bacteriene care are nevoie de această vitamină şi, în consecinţă, care nu se dezvoltă în acelaşi mediu sintetic care nu conţine însă vitamina B_2. Cantitatea de vitamina B_2 (lactoflavină) în preparat va fi cu atît mai mare, cu cît aceasta va permite dezvoltarea bacteriei în diluţii mai mari.

Pentru dozarea lactoflavinei se recurge la un mediu preparat din drojdie de bere din care a fost distrusă vitamina existentă prin căldură sau lumină şi la specia bacteriană *Lactobacillus casei.*

Metode bacteriologice de dozare s-au aplicat şi pentru alte vitamine, găsindu-se, pentru fiecare vitamină, specia sau speciile bacteriene cele mai convenabile, aşa cum se poate vedea în tabelul 14.

Tabelul 14

Speciile bacteriene folosite pentru titrarea unor factori de creştere mai importanţi

Factorul care poate fi titrat	Specia bacteriană folosită
Vitamina B_1 (thiamina, aneurina)	Streptococcus salivarius Lactobacillus fermenti Saccharomyces cerevisiae (o anumită tulpină)
Vitamina B_2 (ribofla vina, lactoflavina)	Lactobacillus casei (o anumită tulpină)
Vitamina B_3 (acidul pantotenic)	Saccharomyces cerevisiae Lactobacillus casei Proteus morganii
Vitamina B_c (acidul folic)	Streptococcus lactis R. Lactobacillus casei Clostridium tetani Clostridium sporogenes
Vitamina B_6 (piridoxina)	Saccharomyces cerevisiae Lactobacillus casei Streptococcus lactis
Vitamina B_{12}	Escherichia coli (variantă obţinută prin iradiere cu raze ultraviolete) Lactobacillus leichmanii
Vitamina H (biotina)	Proteus X_{19} Lactobacillus arabinosus

(Continuare tabelul 14)

Factorul care poate fi titrat	Specia bactariană folosită
Vitamina H_1 (acidul paramino-benzoic)	Lactobacillus arabinosus Acetobacter suboxidans
Vitamina PP (acidul nicotinic)	Staphylococcus aureus Lactobacillus arabinosus Proteus X_{19} Pasteurella animalium

Pentru dozarea fiecărei vitamine se foloseşte un anumit mediu sintetic.

Factorii de plecare sînt substanţele care înlesnesc adaptarea unei specii bacteriene pe medii artificiale de cultură. Există astfel tulpini bacteriene care nu se dezvoltă cînd sînt însămînţate direct din organ decît pe un mediu care conţine anumite substanţe. Astfel, sînt tulpini de *Pasteurella animalium,* care, iniţial, nu cresc decît pe medii cu ser, dar care, după cîteva treceri pe medii cu ser, se dezvoltă şi pe medii lipsite de ser. La fel, tulpinile de *Brucella abortus* nu cresc, iniţial, decît într-o atmosferă îmbogăţită în CO_2, dar, după cîteva treceri în aceste condiţii, ele se adaptează şi se dezvoltă într-o atmosferă normală. Serul sanguin, pentru unele tulpini de *Pasteurella,* CO_2 pentru tulpinile de *Brucella abortus* constituie deci factori de plecare, factori care înlesnesc adaptarea speciilor bacteriene respective la noi condiţii de viaţă.

Stimulinele sînt substanţe care măresc activitatea multiplicatoare a unei tulpini bacteriene, înlesnind deci obţinerea unor culturi mai bogate. Unii streptococi hemolitici, de exemplu, se dezvoltă în bulion simplu, însă dau pe acest mediu o cultură săracă. Adăugînd aceluiaşi mediu ser sanguin sau glucoză, se obţine însă o cultură mult mai bogată. La fel, bacilul rujetului, în bulion glucozat şi cu carne, dă o cultură mai abundentă ca în bulion simplu. Serul sanguin, glucoza etc. sînt stimuline pentru speciile citate, deoarece le stimulează activitatea metabolică.

Scanned with OKEN Scanner

BIOLOGIA BACTERIILOR

PRINCIPALELE MANIFESTĂRI VITALE ALE BACTERIILOR

Viaţa la bacterii se exteriorizează prin diverse manifestări, unele comune tuturor vieţuitoarelor (metabolism, multiplicare), altele caracteristice bacteriilor (patogenitatea, de exemplu). Asimilaţia şi dezasimilaţia sînt procese proprii materiei vii sub orice formă şi le întîlnim, în consecinţă, şi la bacterii. Crearea materiei vii se manifestă la bacterii aproape exclusiv prin multiplicare, prin diviziunea indivizilor existenţi şi nu prin amplificarea dimensiunilor unui individ. Se pare că diviziunea celulei bacteriene este precedată de o creştere a dimensiunilor celulare, dar această creştere constituie un fenomen trecător şi necaracteristic. Primul şi cel mai important fenomen vital la bacterii este multiplicarea ; ea este semnul cel mai sigur al vieţii. În mod practic, o bacterie este considerată vie cînd se multiplică şi moartă, cînd deşi are condiţii favorabile de mediu nu se multiplică.

MULTIPLICAREA

Manifestările vitale ale bacteriilor sînt legate de multiplicare şi aceste manifestări sînt cu atît mai evidente, cu cît multiplicarea este mai intensă, viteza cu care celulele se divid este mai mare.

Se afirmă chiar că exaltarea virulenţei unei tulpini bacteriene, prin treceri pe animale sensibile, este însoţită de o mărire a vitezei de multiplicare şi, invers, o încetinire a energiei multiplicatoare atrage, după S m i r n o v, o micşorare a puterii patogene.

VITEZA DE MULTIPLICARE ŞI DETERMINAREA EI

Se numeşte viteză de multiplicare timpul ce se scurge între două diviziuni ale unei celule. Diverşi cercetători au stabilit o formulă matematică cu ajutorul căreia se poate calcula acest timp pe baza unor date uşor de determinat prin procedee bacteriologice.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste date sînt:

a = numărul germenilor pe unitatea de volum sau suprafața la timpul T_1;
b = numărul germenilor, după un interval de timp de incubație, T_2;
T = diferența dintre T_2 și T_1.

Se notează cu n numărul generațiilor, adică numărul de diviziuni pe care celulele bacteriene le-au realizat în intervalul dintre T_2 și T_1.

Între aceste valori există următoarele relații matematice: b, după o singură diviziune, este egal cu 2 a (deoarece printr-o singură diviziune numărul celulelor (a) se dublează), după două diviziuni b este egal cu 2×2 a; după n diviziuni $b = 2^n a$ sau, aplicînd logaritmii la această egalitate, avem:

$$\log b = \log a + n \log 2; \text{ de unde: } n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$$

Se determină astfel valoarea lui n, durata unei generații rezultînd din formula $\frac{T}{n}$.

Valorile lui a și b se determină prin diverse metode întrebuințate în bacteriologie cu scopul de a determina numărul germenilor dintr-o suspensie (însămînțări în plăci cu geloză, diluții în medii lichide sau determinări biofotometrice). Se constată, în general, că numărul de germeni obținuți prin calcul, după formula de mai sus, și cunoscînd durata unei generații, depășește pe cel aflat prin metoda experimentală. Această neconcordanță se datorește faptului că unii germeni mor în intervalul de timp care separă determinarea valorii lui a și b și ei nu iau deci parte, în tot acest timp, la multiplicare. Ținînd seama de acest fapt, s-a adus un corectiv formulei de mai sus.

Folosindu-se această formulă, s-a putut stabili durata unei generații pentru o serie întreagă de specii bacteriene. Această durată, care reprezintă viteza de multiplicare a unui germen, variază de la o specie bacteriană la alta, iar în cadrul aceleiași specii este în raport cu temperatura și condițiile de mediu. Este bine cunoscut că la o temperatură care nu reprezintă optimul speciei celulele se divid mai încet; de asemenea, în condiții disgenetice de mediu, multiplicarea este mult încetinită. De aceea durata unei generații se dă în funcție de aceste două constante. S-a stabilit, astfel, că durata unei generații pentru *Sallmonella typhi* este de 29 de minute în bulion și la temperatura de 37°C; pentru același germen și la aceeași temperatură, însă nu în bulion, ci în apă peptonată, durata este de 40 de minute. Intervalul de timp între două diviziuni celulare este de 20 — 30 de minute pentru germenii din genurile *Salmonella, Proteus, Vibrio, Escherichia,* de 25 — 35 de minute pentru cei din genul *Staphylococcus,* de 35 — 40 minute pentru speciile din genul *Clostridium,* de 40 — 80 de minute pentru cei din genul *Lactobacillus,* de 30— 240 de minute pentru germenii din genul *Azotobacter* etc.

FAZELE MULTIPLICĂRII BACTERIILOR

Durata unei generații nu este aceeași din momentul însămînțării și pînă ce germenii dintr-o cultură dispar sau se transformă în spori. Inițial, această durată este lungă, se scurtează cu timpul pentru ca bacteria să

atingă cea mai mare viteză a ritmului său de multiplicare şi apoi, cînd numărul germenilor, pe unitatea de volum, a ajuns la o anumită cifră, caracteristică fiecărei specii, această durată să se prelungească din nou pînă la dispariţia oricărei diviziuni celulare. O cultură bacteriană prezintă deci, în cursul existenţei sale, patru faze, care se caracterizează atît prin viteza de multiplicare a germenilor cît şi prin numărul de celule vii pe unitatea de volum. Aceste faze sînt: faza iniţială sau de adaptare; faza de multiplicare activă, logaritmică sau exponenţială; faza staţionară şi faza de declin. Durata acestor diverse perioade din dezvoltarea unei culturi variază de la o specie la alta şi, pentru aceeaşi specie, este în funcţie de diverşi factori externi.

În aceleaşi condiţii de temperatură, mediu şi vîrstă a germenilor însămînţaţi, fiecare specie va avea deci o dezvoltare caracteristică. Această dezvoltare se poate reprezenta grafic înscriind pe abscisă timpul, iar pe ordonată numărul germenilor. Linia obţinută, unind diferitele puncte, este o curbă a cărei formă diferă de la o specie la alta.

Faza iniţială sau de adaptare este perioada de pregătire a celulei în vederea multiplicării, de adaptare a ei la mediu şi, eventual, de modificare a mediului. Adeseori, numai o parte din germenii însămînţaţi într-un mediu ajung să se dividă, restul murind în cursul acestei faze. Numărul germenilor care mor este cu atît mai mare cu cît mediul este mai puţin favorabil. Această putere bactericidă a mediilor disgonice reiese, printre altele, şi din experienţele întreprinse de N. Stamatin şi A. Tacu asupra speciei *Pasteurella animalium*. Autorii folosesc, în experienţele lor, bulion din aceeaşi preparaţie însă avînd pH diferit şi anume 6,6; 7,6 şi 8,6. Din fiecare serie de bulion se repartizează în cîte 10 tuburi, cîte 9 ml de bulion în fiecare tub şi apoi se însămînţează tuburile, din fiecare serie, cu doze de germeni din ce în ce mai mici şi anume descrescînd din 10 în 10. Culturi pozitive se obţin în tuburile celor trei serii de medii însămînţate cu doze mari de germeni şi anume cu 1/10, 1/100, 1/1 000 şi 1/10 000 ml dintr-o cultură în bulion de 24 de ore. Tuburile care conţin bulion cu pH = 6,6 şi însămînţate cu mai puţin de 1/100 000 ml rămîn definitiv sterile, ele neconţinînd germeni transplantabili. În tuburile care conţin bulion cu pH = 8,6, cel mai favorabil pentru această specie bacteriană, se obţin, dimpotrivă, culturi pozitive chiar dacă s-a însămînţat numai a miliarda parte din 1 ml de cultură. Deci, într-un bulion cu pH = 6,6, numărul germenilor care mor, în faza iniţială de pregătire, este însemnat, în timp ce, în acelaşi bulion, însă cu pH = 8,6, acest număr este mult mai mic sau poate egal cu zero. Rezultă din această experienţă că un mediu disgenetic — bulion cu pH = 6,6 în cazul de faţă — poate fi făcut favorabil printr-o însămînţare bogată. Nu s-ar putea preciza mecanismul acestei acţiuni de transformare a unui mediu disgenetic prin germenii vii introduşi. Realizează aceşti germeni o modificare a mediului, aduc ei în mediu factori de creştere sau este vorba de un proces de adaptare şi selecţie?

Observaţii asemănătoare s-au făcut şi cu alte specii bacteriene. Astfel, bacilul tuberculozei însămînţat parcimonios nu se dezvoltă nici pe cartof glicerinat şi nici în bulion glicerinat, dar se obţin, în asemenea condiţii, culturi pe medii cu ou şi glicerină. Pe mediile cu ou, dar fără glicerină, bacilul tuberculozei (tip uman) se dezvoltă mai încet ca pe aceleaşi medii cu glicerină.

Scanned with OKEN Scanner

Dar chiar în mediile socotite că oferă condiţii optime de multiplicare, bacteriile nu încep să se dividă imediat, ci după un interval de timp. Astfel, multiplicarea pasteurelei nu este evidentă, chiar în mediul cu pH = 8,6, decît 5 ore după însămînţarea unei doze suficient de mari — 1 milion pe 1 ml. Care sînt factorii care determină această stagnare a multiplicării celulare? Unii cercetători admit că diviziunea celulară este condiţionată de o transformare a mediului, de o pregătire a lui. Ei îşi sprijină afirmaţiile pe o serie de constatări. Astfel, faza iniţială este cu atît mai scurtă cu cît însămînţarea este mai abundentă şi mediul mai favorabil. În acelaşi sens, se constată următoarele: celulele bacteriene încep imediat diviziunea dacă sînt însămînţate într-un mediu în care s-au mai dezvoltat deja aceleaşi bacterii. Pentru a se demonstra această afirmaţie s-a procedat astfel: o cultură tînără, în care faza iniţială a fost depăşită, se distruge prin căldură sau germenii se elimină prin filtrare şi lichidul astfel sterilizat se însămînţează din nou. La fel, se constată că *Escherichia coli,* în medii sintetice, care conţin glucoză, încep să se multiplice imediat, în timp ce, în aceleaşi condiţii, multiplicarea nu începe decît după cîtva timp dacă glucoza este înlocuită cu maltoză. Aceste diferenţe ar fi datorite faptului că germenul fermentează glucoza prin intermediul unei enzime constitutive, iar maltoza printr-o enzimă adaptivă. Faza de adaptare pentru mediile cu maltoză este cu atît mai lungă, cu cît concentraţia substanţei în mediu este mai mică.

Alţi cercetători leagă necesitatea existenţei acestei faze iniţiale de nevoile de pregătire ale celulei care urmează să se dividă, de unele modificări structurale ale acestei celule. Aceşti cercetători remarcă că această perioadă este cu atît mai lungă cu cît germenii însămînţaţi sînt mai bătrîni, provin din culturi mai vechi şi este inexistentă sau foarte scurtă dacă ei provin dintr-o cultură foarte tînără, în care faza iniţială a fost depăşită. Se constată, în acest sens, că în special germenii proveniţi din culturi vechi îşi măresc, după însămînţare, diametrul longitudinal. *Bacillus megatherium,* de exemplu, în culturile vechi măsoară 3—4 μ lungime, în culturile tinere putînd avea pînă la 15 μ. Alungirea celulelor este urmată de diviziune şi de revenirea la lungimea obişnuită. În acelaşi sens, se constată că *Salmonella typhi murium,* în culturi vechi de 4 ore, are o lungime medie de 2,35 $\times$ 0,79 μ iar în culturile de 26 de ore, 1,13 $\times$ 0,49 μ. Aceste modificări structurale ale celulelor care urmează să se dividă sînt interpretate, de aceşti autori, ca fenomene de întinerire. Asemenea modificări de ordin protoplasmatic se întîlnesc, în condiţii similare, şi la alte fiinţe monocelulare.

Dimensiunile celulelor bacteriene sînt cu atît mai mari cu cît concentraţia în germeni a unui mediu este mai mică. Bogăţia mediului în principii nutritivi condiţionează dimensiunile bacteriilor; în general, cu cît mediul este mai bogat în principii nutritivi cu atît celulele sînt mai mari.

Aceste schimbări de ordin morfologic sînt însoţite şi de modificări de natură fiziologică. Unii cercetători constată, într-adevăr, că celulele culturilor tinere sînt mult mai sensibile ca cele bătrîne faţă de soluţia hipertonică de clorură de sodiu sau faţă de antiseptice. Astfel, soluţiile 2% de clorură de sodiu nu ucid, într-o oră, nici un germen din suspensia unei culturi de *Escherichia coli* de 21 de ore la 37°C, în timp ce aceeaşi soluţie este

extrem de bactericidă față de o suspensie de germeni dintr-o cultură de $3^1/_2$ ore la 37°C. Această sensibilitate se explică prin diferențele de permeabilitate a membranei celulare la cele două feluri de celule.

Metabolismul celular este la fel foarte activ în perioada de adaptare la mediu. Se constată, în acest sens, că există un raport direct între dimensiunile celulei bacteriene pe de o parte, și consumul de oxigen și eliminarea de CO_2 pe de altă parte. La sfîrșitul fazei inițiale de creștere celulele au cele mai mari dimensiuni, dar și cel mai ridicat consum de oxigen și cea mai bogată eliminare de CO_2.

Faza de multiplicare activă, logaritmică sau exponențială urmează perioadei de pregătire și se caracterizează printr-o succesiune rapidă a generațiilor microbiene. Viteza de succesiune a generațiilor este condiționată de temperatură, mediu și specia bacteriană.

Durata fazei logaritmice este, în plus, condiționată de abundența însămînțării. Este lesne de înțeles că diviziunea unui număr mare de bacterii va atinge mai curînd cifra concentrației maxime ca un număr mic. Unii cercetători au stabilit că pentru *Escherichia coli* durata perioadei logaritmice este în funcție de temperatură. Ea este de 6—$7^1/_2$ ore la 37°C, de 8—$8^1/_2$ ore la 30°C, de 11—15 ore la 25°C și de 14—24 de ore la 20° C. În faza activă de multiplicare, B o i v i n și colaboratorii (1947) constată o creștere a concentrației acidului ribonucleic în celule.

Faza staționară urmează fazei logaritmice și se caracterizează prin menținerea, pentru un timp oarecare, a unui număr constant de germeni pe unitatea de volum sau suprafață. Multiplicarea bacteriilor, dincolo de acest număr, caracteristic fiecărei specii, nu mai este posibilă, deși în mediu, așa cum ne arată experiențe simple, există încă principii nutritivi în cantitate suficientă. Astfel, dacă germenii dintr-o cultură ajunsă în faza staționară sînt eliminați prin filtrare, iar filtratul, astfel obținut, se însămînțează cu același germen, se obține o cultură tot așa de abundentă ca și prima. Această experiență arată că în mediu, la sfîrșitul perioadei logaritmice, există, pe de o parte, principii nutritivi, iar, pe de altă parte, că produșii de dezasimilație nu au atins concentrații care să inhibe diviziunea celulară. Ceea ce lipsește acestor germeni ca să se multiplice nu este elementul nutritiv, ci spațiul. Într-adevăr, se constată că o celulă bacteriană pentru a exercita funcțiunile sale vitale are nevoie de un spațiu ale cărui dimensiuni variază de la o specie la alta și, pentru aceeași specie, de la un mediu biologic la altul. Numeroase experiențe confirmă acest punct de vedere. Astfel, dacă într-un mediu lichid se pun, în suspensie, un număr de germeni care depășește concentrația maximă a speciei, se constată că o parte din bacteriile adăugate mor și, în curînd, în mediu se stabilește concentrația limită a speciei. Germenii care nu aveau spațiu au fost eliminați. Dar ceea ce este important din punct de vedere biologic și ceea ce trebuie relevat este că spațiul necesar unei celule bacteriene nu este fix și el poate varia la aceeași specie în raport cu condițiile mediului ambiant. Astfel, unii autori obțin, în medii aerate și conținînd și un zahar fermentat de specia considerată, o depășire a concentrației maxime. Dimpotrivă, absența oxigenului dintr-un mediu influențează concentrația maximă a speciilor aerobe. *Salmonella typhi murium,* de exemplu, în anaerobioză, dă o cultură cu o concentrație maximă de 500 milioane de germeni pe 1 ml, în aerobioză această

Scanned with OKEN Scanner

concentrație este de 2 miliarde, iar în mediu oxigenat de 8 miliarde. La fel, s-a mai constatat că zaharurile, care pot fi folosite de bacterii în absența oxigenului, favorizează multiplicarea bacteriilor, reducîndu-le nevoile lor de oxigen și deci de spațiu. Necesitatea de spațiu trebuie, în consecință, înțeleasă în sens biologic și nu fizic.

Bacteria își reduce spațiul nutritiv în raport cu bogăția mediului în principii nutritivi. Într-un mediu sărac ea are nevoie de un spațiu mai mare ca într-unul bogat în principii nutritivi. Bacteriile se comportă deci, și din acest punct de vedere, ca toate celelalte viețuitoare.

Multiplicarea, în cursul fazei staționare, nu încetează cu desăvîrșire, dar ea se limitează la înlocuirea bacteriilor care mor. Această multiplicare de acoperire a golurilor continuă atît timp cît mediul conține materiile nutritive necesare, iar produșii de dezasimilație nu au atins o concentrație care poate să o împiedice. O dată mediul epuizat de principii nutritivi sau devenit toxic pentru celule, concentrația maximă nu se mai poate menține, numărul germenilor începe să scadă sub această cifră, iar cultura intră în faza de declin.

Faza de declin se caracterizează printr-un număr de germeni, pe unitatea de volum, mai mic ca cel din perioada staționară. Divizarea celulelor nu este totdeauna total abolită ; în unele culturi ea persistă, dar se manifestă neregulat și trecător. Este o multiplicare spasmodică și ea nu poate modifica sfîrșitul populației microbiene dintr-un mediu. Acest sfîrșit se produce, la unele specii, foarte repede, la altele mult mai încet. Culturile de gonococ, pneumococ, meningococ, streptococ etc. mor în cîteva săptămîni. Mediile speciale adaptate cultivării acestor specii pot prelungi, într-o oarecare măsură, viabilitatea acestor culturi dincolo de acest termen. Alte specii, chiar pe medii obișnuite, pot persista ani de zile, în aceeași cultură, deși sînt lipsite de spori. Astfel se comportă unele tulpini de bacilii rujetului, tifosului, paratifosului, etc.

Diminuarea numărului de germeni dintr-o cultură poate fi datorită, în unele cazuri, modificărilor de pH. Se observă, în acest sens, că în culturile de *Escherichia coli,* în bulion glucozat, pH-ul scade după 18 ore de la însămînțare de la 7,2 la 4,8, iar numărul germenilor se reduce la 12 000 pe 1 ml. El poate crește însă pînă la 192 milioane pe 1 ml, dacă se corectează pH-ul mediului.

Multiplicarea bacteriilor a putut fi urmărită, în bune condiții, in vitro, pe mediile de cultură. In vivo, acest studiu nu poate fi făcut cu aceeași precizie. Fazele dezvoltării unui germen patogen în organism au, foarte probabil, altă durată și raporturile dintre aceste faze sînt altele decît cele observate in vitro. Factorii inhibitori organici, elementele imunității, influențează, alături de alți factori, multiplicarea.

Dar chiar in vitro, studiul populațiilor bacteriene aparținînd speciilor sporulate este foarte complicat. Sporul, deși celulă vie, este inactiv din punct de vedere al concentrației vitale ; el nu intervine deci în stabilirea concentrației maxime, dar apare în numărătorile pe care le facem. Concentrația maximă a unei asemenea specii, nu este aceea pe care ne-o dau numărătorile, ci această cifră din care se scade numărul sporilor.

Scanned with OKEN Scanner

PATOGENITATEA

Patogenitatea este strîns legată de capacitatea de multiplicare a germenilor, deci de celula vie. Procesele patogene sînt, de cele mai multe ori, o urmare a multiplicării bacteriilor în țesuturi. Gravitatea intoxicațiilor bacteriene este la fel în raport cu viteza de multiplicare a celulelor ; cu cît acestea se multiplică mai repede, cu atît, în general, cantitatea de toxină pe care o eliberează este mai mare și procesul patologic mai grav.

MOBILITATEA

Bacteriile vii, în cazul cînd aparțin speciilor ciliate, sînt mobile, în anumite condiții de mediu și dezvoltare ; cele moarte, chiar dacă au cili și se găsesc în condiții propice, sînt imobile. Deplasările în mediu permit celulei să se apropie, de exemplu, de o materie nutritivă sau să se îndepărteze de o substanță nocivă. Substanțele care atrag bacteriile exercită un chimiotactism pozitiv, iar cele care le resping, un chimiotactism negativ. Tropismul bacterian explică, după unii autori, forma coloniilor pe mediile solide, în special constituirea prelungirilor laterale. Dezvoltarea bacteriilor aerobe, la suprafața mediilor lichide, ar fi datorită chimiotactismului pozitiv exercitat de oxigen, în timp ce dezvoltarea anaerobilor, în profunzimea mediilor, ar fi o consecință a chimiotactismului negativ exercitat de același gaz, față de acești germeni.

PRODUCEREA DE PIGMENȚI

Pigmenții sînt secretați de diverse specii bacteriene ; ei diferă în ceea ce privește culoarea de la o specie la alta. Astfel, un pigment galben-citrin este întîlnit la unii stafilococi și la unele sarcine, galben-portocaliu la unii stafilococi și la unele tipuri de bacili ai tuberculozei, roșu la specii din genul *Serratia,* albastru la unii germeni care înălbăstresc laptele — *Bacillus cyanogenes* — albastru-verzui la *B. pyocyaneus,* brun-ciocolatiu la *B. mallei,* verde-fluorescent la *B. fluorescens liquefaciens* etc. Natura chimică a acestor pigmenți este variabilă. Unii dintre ei sînt solubili în apă, alții sînt de natură lipidică și se dizolvă în solvenți organici ca alcoolul etilic, alcoolul metilic, eterul sulfuric, acetona etc. Unii se secretă în mediu și colorează mediile lichide în care se dezvoltă bacteria respectivă, alții nu colorează decît coloniile formate pe agar sau alte medii solide, lichidele păstrîndu-și culoarea inițială.

Producerea de pigment este în funcție de o serie de factori de mediu. Astfel, *Bacillus pyocyaneus* nu secretă pigmentul său caracteristic în mediu lipsite de peptonă ; pigmenții negri, care sînt produși de oxidare a tirozinei, nu apar în absența acestui aminoacid, pigmentul ciocolatiu al bacilului morvei se produce numai pe cartof glicerinat ; apariția pigmentului fluorescent este legată de prezența, în mediu, a fosfaților, iar pigmentul roz secretat de *B. prodigiosus* de prezența magneziului și sulfului. *Escherichia coli* secretă, în medii cu peptonă și roșu neutru, un pigment galben-fluores-

cent; această substanţă rezultă dintr-o modificare metabolică a roşului neutru.

Temperatura mediului influenţează formarea pigmentului. În general, orice cauză care diminuează activitatea multiplicatoare a celulelor micşorează producerea de pigment.

PRODUCEREA DE LUMINĂ

Unele specii bacteriene aerobe şi saprofite care se găsesc în ape, în special în cele de mare, pe peşti morţi sau pe carne produc lumină. Lumina emisă de aceste bacterii este vizibilă mai ales în întuneric şi se datoreşte substanţelor care iau naştere în cursul metabolismului acestor bacterii, substanţe care devin luminoase în prezenţa oxigenului liber. Această substanţă a fost numită luciferină şi ea este oxidată prin intermediul unei enzime numită luciferază.

Intensitatea radiaţiilor luminoase este, pentru unele specii, destul de accentuată, ceea ce a permis să se fotografieze o asemenea cultură la lumina emisă de ea însăşi. Unii autori au încercat să dea acestei lumini şi scopuri practice şi anume să o folosească la iluminarea incintelor care conţin materiale inflamabile. Rezultatele acestor încercări cu aşa-numita lumină rece au fost negative.

Producerea de lumină este legată de viaţa bacteriei, de metabolismul ei; factorii care alterează vitalitatea celulară influenţează şi această lucigeneză. Se pare că formarea unor asemenea substanţe depăşeşte, în unele cazuri, necesităţile imediate şi de aceea culturile îşi mai păstrează luminozitatea cîteva ore după moarte. În laborator, prin treceri repetate pe medii de cultură, bacteriile pierd proprietatea de a emite radiaţii luminoase şi în vederea conservării acestei însuşiri se recomandă medii speciale.

PRODUCEREA DE CĂLDURĂ

Căldura se produce în cursul multiplicării bacteriilor, ca rezultat al reacţiilor chimice exotermice provocate de enzimele celulare. În general, această termogeneză este foarte redusă, dar metodele fizice permit măsurarea ei. S-a construit, în acest scop, un microcalorimetru. Unele procese fermentative, de natură bacteriană, sînt însoţite de o producere însemnată de căldură — fermentarea gunoiului de grajd, de exemplu.

INFLUENŢA DIVERŞILOR FACTORI DIN MEDIU ASUPRA BACTERIILOR

Flora bacteriană este extrem de răspîndită pe globul pămîntesc. Speciile care constituie flora diverselor regiuni terestre este variabilă. Factorii care condiţionează această variabilitate sînt multipli. Astfel, speciile care folosesc substanţe răspîndite pe toată planeta sînt ubicvitare, dar cele care utilizează principii nutritivi puţin răspîndiţi se vor găsi în ariile geografice care conţin asemenea principii. Astfel, bacteriile care oxidează hi-

drogenul sulfurat, creîndu-şi prin acest proces un izvor de energie, se vor găsi în zonele în care există acest gaz, de obicei în apele în care se produce o fermentaţie a substanţelor organice cu degajarea de hidrogen sulfurat. Unele specii cum sînt, printre altele, speciile de clostridieni patogeni, găsesc în pămînt condiţii favorabile şi au, pentru acest motiv, o răspîndire universală. Răspîndirea unor specii parazite obligatorii este legată de răspîndirea gazdelor receptive. Bacilul tuberculozei, parazit al omului şi al unor specii de animale, îl găsim oriunde vom întîlni specii sensibile. Aria geografică a unor paraziţi obligatorii a putut fi limitată prin măsuri sanitare, tocmai datorită faptului că ei sînt strîns legaţi de gazda receptivă; limităm răspîndirea germenului, împiedicînd circulaţia purtătorilor de paraziţi, de contagiu; procedîndu-se, în acest fel, s-a ajuns la limitarea ariilor geografice a unor specii extrem de periculoase cum sînt *Vibrio cholerae, Pasteurella pestis, Bacterium mallei* etc.

Prezenţa principiilor nutritivi este esenţială pentru multiplicarea bacteriilor, dar nu este o condiţie suficientă. Alţi factori fizici sau chimici ca temperatura, presiunea osmotică, pH-ul, umiditatea, oxigenul, diverse radiaţii, diferite substanţe chimice, etc. intervin în acest proces înlesnindu-l sau inhibîndu-l.

INFLUENŢA TEMPERATURII MEDIULUI AMBIANT ASUPRA BACTERIILOR

Temperatura ca factor de mediu o vom privi din două puncte de vedere şi anume: al influenţei sale asupra multiplicării şi al influenţei asupra conservării.

INFLUENŢA TEMPERATURII ASUPRA MULTIPLICĂRII BACTERIILOR

Bacteriile se multiplică între limite de temperatură care variază de la o specie la alta sau de la un grup de specii la altul. Unele bacterii se multiplică la temperaturi scăzute, altele la temperaturi medii de 30—40°, apropiate de ale organismelor homeoterme, iar altele la temperaturi mai mari de 40°. Privite din acest punct de vedere bacteriile au fost împărţite în trei grupe şi anume: psychrophile, mezophile şi thermophile.

Bacteriile psychrophile sau bacteriile frigului se multiplică şi la O°C, optimul de dezvoltare fiind cuprins între 5 şi 20° C, iar temperatura maximă tolerată este de 30° C. Speciile psychrophile se găsesc, de regulă, în pămînt sau apă şi sînt saprofite. In această grupă se găsesc specii fosforescente (J a h n, citat de L e v i n, 1898).

Bacteriile mezophile au optimul de dezvoltare la 36—38° C, limita inferioară fiind în jurul temperaturii de 10° C, iar cea superioară 45° C. Grupa cuprinde specii patogene şi saprofite.

Bacteriile patogene sînt mezophile, optimul de dezvoltare precum şi limitele inferioară şi superioară variază, în limite largi, de la o specie la alta. Gonococul de pildă se dezvoltă în condiţii optime la 37°C şi multiplicarea încetează sub 30° C şi deasupra lui 38,5° C. Bacilul tuberculozei mamiferelor nu creşte sub 29° C şi nici peste 41° C, optimul fiind cuprins între 36 şi 38° C; bacilul tuberculozei aviare creşte în condiţii optime la

37—43° C, dar nu se mai multiplică sub 35° C şi nici peste 45° C. Speciile patogene, care se găsesc obişnuit în mediul exterior, se dezvoltă la temperaturi relativ scăzute; stafilococul auriu creşte încă la 6° C, bacilul cărbunelui la 7° C, iar *Salmonella typhosa* la 9° C.

Limitele de dezvoltare pot fi condiţionate şi de mediile de cultură; în general, în medii defavorabile, dezvoltarea se face în limite mai restrînse ca pe medii convenabile.

Bacteriile termophile se găsesc în pămînt, ape termale, platforme de bălegar, produse lactate, silozuri de furaje etc.; limita inferioară este de 40° C, cea superioară fiind de 70° C sau chiar 90° C; temperatura optimă este cuprinsă între 45 şi 55° C. Bacteriile termophile se pot adapta şi dezvolta la temperaturi mai joase, devenind mezophile.

Unele bacterii termophile au întrebuinţări largi în industria laptelui, furajelor etc. Astfel, unele specii din genul *Lactobacillus,* cum sînt *L. bulgaricus, L. caucasicus, L. casei, L. lactis, L. helveticus* etc. se dezvoltă la temperaturi cuprinse între 20 şi 50°C, cu un optimum la 40—50°C, şi se folosesc la obţinerea diferitelor preparate de lapte, iaurt, kefir, precum şi la fabricarea brînzeturilor şi untului. Aceşti germeni produc, pe socoteala substanţelor hidrocarbonate, în special a lactozei, acizi volatili care dau produsului alimentar un gust plăcut. La fel, *Lactobacillus delbrückii* este folosit în prepararea furajului murat în silozuri sau în gropi. Acest germen are temperatura optimă de dezvoltare 45° C, iar pH-ul optim în jurul cifrei 4. La o asemenea temperatură şi pH, pe care el însuşi le creează în silozuri, nici un alt germen nu se multiplică şi *L. delbrückii* se dezvoltă aproape în cultură pură. Prezenţa sa în cultură aproape pură asigură o bună conservare furajelor, conferindu-le în acelaşi timp un gust plăcut, care se datoreşte acidului lactic rezultat din fermentaţia substanţelor hidrocarbonate, din furaje, de către bacil.

INFLUENŢA TEMPERATURII ASUPRA CONSERVĂRII BACTERIILOR

Acţiunea frigului. Temperaturile care depăşesc într-un sens sau altul limitele de dezvoltare împiedică desfăşurarea proceselor vitale, dar nu ucid celula decît în cazul cînd s-au depărtat prea mult de aceste limite. Temperaturile inferioare optimului de dezvoltare sînt, în general, bine suportate de bacterii; mai mult încă, la asemenea temperaturi ele îşi conservă, în condiţii optime, atributele speciei şi, mai cu seamă, puterea patogenă. Tulpinile de streptococi, pneumococi etc. se păstrează 30 de zile sau mai mult la temperaturi joase de 0 pînă la —4° C, dar mor relativ repede la temperatura camerei sau la termostat. Temperaturile foarte scăzute nu par a altera vitalitatea bacteriilor. Tulpinile de vibrionul holerei rezistă, de exemplu, 1 lună de zile la —15° C. *Salmonella typhosa, Bacillus anthracis, Staphylococcus aureus* nu se distrug, după unele cercetări, cînd sînt ţinute 20 de ore în aer lichid, — 183° pînă la — 190° C. Unii autori constată că o bacterie luminescenţă nu este distrusă în 10 ore la temperatura de —252°C (hidrogen lichid). Unele bacterii — cum sînt cele din genul *Escherichia,* de exemplu — se conservă mai bine la —20° C decît la —2° C.

Acţiunea căldurii. Temperaturile care depăşesc limita superioară de dezvoltare sînt mai greu suportate ca cele care depăşesc limita inferioară. Bacteriile, sub forma lor vegetativă, sînt omorîte, în marea lor majoritate, în

Scanned with OKEN Scanner

30 de minute la 65° C; sînt însă specii care sînt distruse la temperaturi mai mici şi într-un timp mai scurt, după cum sînt specii care rezistă mult timp la temperaturi de 50° C sau chiar mai mult. Căldura uscată este mai puţin activă şi distruge formele vegetativ, în totalitatea lor, în 90 de minute, la 100° C. De altfel, bacteriile, ca şi virusurile, sub forma lor uscată, sînt mai rezistente la căldură decît bacteriile care se găsesc în lichide. Astfel, bacilul tifosului în culturi în bulion este distrus cînd mediul este încălzit 30—60 de minute la 60° C; acelaşi bacil, uscat într-un tub din care s-a scos aerul, rezistă 30 de minute la 115° C.

Datele relatate mai sus sînt valabile pentru formele vegetative, dar nu pentru spori. Aceştia rezistă la temperaturi care ucid formele vegetative. Astfel temperatura de 56° C sau chiar 60° C este suportată de sporii bacterieni şi nici o cultură sporulată nu poate fi distrusă printr-o încălzire la 60—65° C. Sporii unor specii rezistă chiar cîteva ore la temperatura de fierbere a apei şi nu pot fi distruşi, în mod sigur, decît la temperaturi care depăşesc 100° C. Căldura umedă este mai activă decît cea uscată. Practic, sterilizarea este asigurată prin căldură umedă în 30 de minute la 120° C (presiunea de 1 atmosferă manometrică), în 2 minute la 134° C (presiunea de 2 atmosfere manometrice), sau, prin căldură uscată, în 3 ore la 140° C, în 60—90 de minute la 140—150° C şi în 20—30 de secunde la 400° C.

INFLUENŢA GRADULUI DE IONIZARE A MEDIULUI ASUPRA BACTERIILOR

Desfăşurarea proceselor vitale ale bacteriilor este condiţionată şi de pH-ul mediului de cultură. Fiecare specie se dezvoltă, în condiţii optime, la un anumit pH; la valori inferioare sau superioare acestei valori optime [1], procesele vitale pierd din intensitate, pentru a înceta complet cînd aciditatea sau alcalinitatea au depăşit limitele suportate de specia considerată.

S-a stabilit, pentru o serie de specii patogene, valorile limită şi pH-ul optim.

Tabelul 15

Limitele de dezvoltare şi pH-ul optim de dezvoltare la diferite bacterii

Specia bacteriană	Limite de pH de dezvoltare	pH optim
Bacillus anthracis	6,0—8,5	7,0—7,4
Clostridium sporogenes şi Clostridium histolyticum	5,8—8,5	6,0—7,6
Clostridium welchii şi Clostridium tetani	5,5—8,3	7,0—7,6
Corynebacterium difteriae	6,0—8,3	7,3—7,6
Diplococcus pneumoniae (tip I, II şi III)	7,0—8,3	7,8
Escherichia coli	4,4—7,8	6,0—7,0
Lactobacillus delbrückii	—	3,5—4,6

[1] Trebuie socotit că un mediu are un pH optim cînd el permite dezvoltarea celui mai mic număr de germeni în timpul cel mai scurt. pH-ul optim al unui mediu se stabileşte comparativ.

Scanned with OKEN Scanner

(*continuare Tabelul 15*

Specia bacteriană	Limita de pH de dezvoltare	pH optim
Neisseria gonohrreae	6,0—8,3	7,3
Pasteurella animalium	6,8—8,6	8,0—8,6
Pasteurella pestis	5,6—7,5	6,5—7,1
Proteus vulgaris	4,4—8,4	6,0—7,0
Pseudomonas aeruginosa	5,6—8,0	6,6—7,0
Salmonella typhosa	6,2—7,6	6,8—7,2
Salmonella paratyphi A.	4,5—7,8	6,4—7,0
Salmonella paratyphi B.	4,5—8,0	6,4—7,2
Salmonella suipestifer	5,0—8,2	7,0—7,6
Staphylococcus pyogene	5,6—8,1	7,2—7,6
Vibrio cholerae	6,4—7,0	7,0—7,4

În general, bacteriile patogene se dezvoltă, în condiţii optime, la un pH neutru sau uşor alcalin, care corespunde şi gradului de ionizare a umorilor şi ţesuturilor organismelor animale. Mediile care depăşesc, într-un sens sau altul, limitele de dezvoltare a unei specii, devin toxice pentru celulele respective.

Toxicitatea se datoreşte ionilor — hidrogeni sau oxidrili — disociaţi din acizii sau bazele respective. Ionii de hidrogen, deci mediile acide, sînt mai toxici ca ionii oxidrilici, deci mediile alcaline. Pneumococul este unul din germenii cei mai sensibili faţă de ionii de hidrogen ; mediile uşor acide distrug culturile acestui germen ; în schimb, el suportă mediile alcaline, rezistînd oxidrililor care se găsesc în asemenea medii.

Unele specii saprofite se dezvoltă în condiţii optime în medii puternic acide, rezistînd acţiunii toxice a ionilor de hidrogen ; astfel se comportă bacteriile care oxidează sulful sau hidrogenul sulfurat în acid sulfuric ; pH-ul optim, pentru aceste bacterii, este egal cu 3—4, ele putînd suporta un pH egal cu 0,6. Unele tulpini de stafilococ suportă, în bune condiţii, o importantă concentraţie de ioni oxidrilici, putîndu-se dezvolta la un pH egal cu 10.

INFLUENŢA PRESIUNII OSMOTICE A MEDIULUI ASUPRA BACTERIILOR

Membrana bacteriană fiind, în condiţii fiziologice, permeabilă, concentraţia electroliţilor în mediu nu poate rămîne fără influenţă asupra celulei. Mediile izotonice permit desfăşurarea normală a vieţii celulare. Tulburări fiziologice şi morfologice apar cînd concentraţia sărurilor se depărtează, într-un sens sau altul, de izotonie şi sînt cu atît mai manifeste cu cît depărtarea este mai accentuată. In mediile hipertonice se produce o dezhidratare a celulei din cauză că apa difuzează în afară mai repede decît difuzează sărurile din mediu în interiorul celulei. Această dezhidratare se traduce morfologic printr-o ratatinare a celulei, printr-o desprindere a protoplasmei de membrană. In mediile hipotonice se produce, dimpotrivă, o hidratare a celulei şi o tumefiere a ei. Fenomenul de ratatinare numit şi

plasmoliză, ca şi cel de tumefiere numit şi *plasmoptiză* se explică prin inegala permeabilitate a membranei celulare pentru apă şi săruri ; membrana este mai permeabilă pentru apă decît pentru săruri şi de aceea difuziunea apei şi cea a sărurilor se fac cu viteze diferite, ceea ce provoacă modificările de ordin morfologic. Aceste modificări nu sînt permanente ; celulele pot reveni la forma normală cînd sînt trecute în mediile izotonice. Această adaptare a celulei este posibilă atunci cînd hipertonicitatea sau hipotonicitatea nu a alterat iremediabil celula. Soluţiile puternic hipertonice ca şi cele mult hipotonice pot omorî bacteriile. Sensibilitatea diverselor specii bacteriene faţă de concentraţia de săruri variază în raport cu specia. Vibrionii holerei, bacilii tifosului, pneumococii, meningococii, culturile tinere de colibacili sînt, de exemplu, repede distruse în soluţii 5% de clorură de sodiu, în timp ce *Bacillus anthracis, Staphylococcus pyogenes* rezistă mai mult timp în aceste soluţii. *Bacillus subtilis* se multiplică în soluţii concentrate de săruri : 9% clorură de sodiu, 10% azotat de potasiu sau 11% clorură de potasiu. Bacteriile halofile (cu afinitate pentru halogeni) se dezvoltă în medii cu o concentraţie de 30% clorură de sodiu. S p r i n t şi P i j p e r (1952) descriu o asemenea specie care se dezvoltă într-un mediu cu 28% ClNa şi 7,2% NO_3Na ; germenul reduce nitraţii în nitriţi şi produce un pigment roşu. Asemenea specii pigmentate în roşu şi halofile se dezvoltă pe peştele sărat şi îi depreciază valoarea. În apa distilată, unii germeni, cum sînt pneumococii, meningococii etc. se lizează într-un timp foarte scurt, în timp ce colibacilii sînt transplantaţi chiar după ce au stat 24 de ore în apă distilată. Distrugerea celulelor se face mai cu uşurinţă atunci cînd ele sînt trecute brusc dintr-o soluţie hipertonică într-o soluţie hipotonică sau invers.

Tulburările celulare de ordin osmotic se observă la celulele vii şi nu la cele moarte şi ele sînt mai grave la celulele tinere şi mai puţin grave la cele bătrîne.

INFLUENŢA LUMINII ŞI A RADIAŢIILOR ULTRAVIOLETE ASUPRA BACTERIILOR

Lumina solară este considerată ca unul din principalii factori sterilizanţi ai mediului. Cercetările experimentale au confirmat această opinie dovedind că, prin expunere la lumină, culturile bacteriene sînt ucise. Valoarea acţiunii destructive a luminii variază în raport cu natura germenilor. Streptococii sînt, dintre bacteriile patogene, cei mai sensibili, iar stafilococii şi colibacilii cei mai rezistenţi. Sporii sînt mai rezistenţi ca formele vegetative. S-a arătat, în acest sens, că formele vegetative ale bacteridiei cărbunelui, expuse într-o picătură de lichid, la soare, sînt omorîte într-o proporţie de 99% în 30 de minute, în timp ce sporii rezistă, în aceleaşi condiţii, pînă la 2 ore. La rîndul lor, sporii din culturile tinere sînt mai sensibile ca cei din culturi vechi. Celulele tinere sînt, după unii autori, mai sensibile ca cele bătrîne, bacilii Gram pozitivi mai rezistenţi ca cei Gram negativi.

Acţiunea sterilizantă a luminii poate fi accentuată în prezenţa altor factori fizici. S-a arătat, în acest sens, că sporii bacteridiei cărbunelui în suspensie în apă sau bulion sînt distruşi de lumina solară, în prezenţa oxi-

Scanned with OKEN Scanner

genului, în 44 de ore, în timp ce în absența acestui gaz ei rezistă cîteva zile. Lumina este mai activă la temperaturi ridicate, 30° C, decît la temperaturi joase, 16° C. Unele substanțe fluorescente ca eozina, compușii acriflavinici etc. accentuează acțiunea bactericidă a luminii. pH-ul lichidului în care se găsesc bacteriile nu mărește și nu micșorează nocivitatea luminii.

Diferitele radiații ale spectrului solar nu sînt egal de active. Cercetările întreprinse, în această direcție, au arătat că radiațiile de undă scurtă sînt mai active ca cele lungi. Puterea bactericidă este deci invers proporțională cu lungimea de undă. Astfel, radiațiile cu o lungime de undă de 200—250 milimicroni sînt, așa cum a arătat B i c încă din 1904, de 10—12 ori mai active decît spectrul solar în întregime. Aceste radiații, care corespund zonei ultraviolete a spectrului solar, au fost îndeaproape cercetate în ceea ce privește activitatea lor bactericidă. S-a putut constata, în cursul acestor cercetări, că ele au un efect nociv nu numai asupra bacteriilor care se găsesc în culturi, dar și asupra celor ce se găsesc în țesuturi, în procesele patologice. Această constatare a dus la aplicarea acestor radiații în terapeutica bolilor bacteriene, cu localizare externă (infecții cutanate, în special).

Radiațiile luminoase, în doze care nu omoară celulele bacteriene, pot provoca asupra lor diverse modificări; bacteriile iradiate pot astfel pierde mobilitatea, unele proprietăți fermentative, patogenitatea etc.

Mecanismul acțiunii nocive a luminii nu este cunoscut. Numeroși autori admit că nocivitatea ar fi datorită peroxidului care se produce în mediile iradiate. Se observă în acest sens, că mediile iradiate și care au devenit, în urma acestui proces, incapabile să cultive un germen sensibil la radiațiile ultraviolete se pot transforma în medii propice dacă li se adaugă catalază, ferment care descompune peroxidul. În același sens, se constată un paralelism perfect între sensibilitatea față de radiațiile ultraviolete și față de peroxid. Alți autori admit însă că acțiunea nocivă a luminii se datorește energiei fotoelectrice a radiațiilor ultraviolete. Acestea ar provoca, în plasma celulară, prin deplasările electronice, modificări moleculare ireversibile și incompatibile cu viața.

Acțiunea razelor Roentgen, cea a razelor catodice sau a celor emise de elementele radioactive asupra bacteriilor au fost studiate de diverși cercetători. S-a constatat, în acest sens, că bacteriile supuse radioactivității își pot modifica unele proprietăți.

INFLUENȚA ULTRASUNETELOR ASUPRA BACTERIILOR

Ultrasunetele provoacă tulburări grave la animale, așa cum a observat L a n g e v i n, încă din 1917. H a r v e y și L o o m i s (1932) au arătat că ouăle de arici de mare sînt distruse de oscilațiile acustice în 1/1 200 de secundă. Globulele roșii sînt hemolizate într-un interval de timp care variază în raport cu intensitatea undelor folosite și cu concentrația lor pe unitatea de volum. Acțiunea nocivă a undelor sonore se datorește fenomenului de cavitație, de creare a unor cavități în continuitatea lichidului. Bacteriile sînt și ele dezintegrate, rupte de energia undelor ultrasonore. Într-adevăr, o suspensie microbiană densă, supusă acțiunii ultrasunetelor,

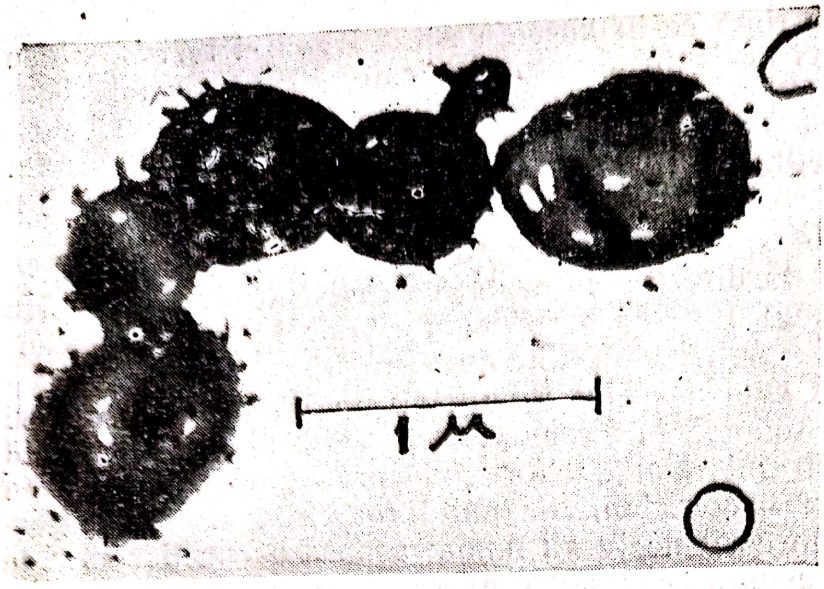


Fig. 14 —Celulele speciei *Streptococcus pyogenes* supuse vibraţiilor ultrasonore. Imagine electronică (după **Mudd şi Lackmann**)
Cele două celule centrale sînt normale, iar cele trei terminale sînt lizate (x 34 100)

se limpezeşte, componenţii chimici ai celulei punîndu-se în libertate. La fel se pun în libertate granulaţiile cianofile ale bacilului tuberculozei, unii fermenţi endocelulari etc. Astfel, din *Proteus vulgaris* şi *Clostridium histolyticum* s-au extras fermenţi care oxidează alfa-aminoacizii. Dezintegrarea celulară prin vibraţiile ultrasonore prezintă o deosebită importanţă pentru studiile chimice şi biologice, ea permiţînd să se obţină anumiţi complecşi cu structura chimică pe care o au în celule. Sensibilitatea faţă de undele ultrasonore variază de la o specie bacteriană la alta. Astfel, Grabar şi Royer (1945) consideră că *Bacillus anthracis* este cel mai sensibil, iar *Mycobacterium tuberculosis* cel mai rezistent; o situaţie intermediară o ocupă celelalte specii, dar, printre ele, cocii sînt mai rezistenţi decît formele bacilare. Tulpinile de bacili ai tuberculozei nu se comportă toate la fel şi, după Laporte şi colaboratorii (1945), bacilii tulpinii B.C.G. sînt mai sensibili ca cei ai tulpinilor virulente. Sporii sînt mai rezistenţi ca formele vegetative, dar totuşi pot fi şi ei distruşi printr-o sonorizare prelungită şi de mare intensitate (Elpiner, 1952).

Toxinele bacteriene, cum este toxina bacilului difteriei, ca şi unii fermenţi, cum este catalaza din sînge, se pot inactiva sub acţiunea vibraţiilor ultrasonore.

Activitatea destructivă a ultrasunetelor îşi poate găsi aplicaţii practice în sterilizarea unor lichide (lapte) sau în transformarea unor bacterii în vaccinuri.

INFLUENŢA UNOR SUBSTANŢE CHIMICE ASUPRA BACTERIILOR

Substanţele chimice, privite din punct de vedere al acţiunii lor asupra celulei bacteriene, pot fi împărţite în trei grupe: utile, indiferente şi nocive. Acest mod diferit de comportare iese în evidenţă atunci cînd diversele substanţe se găsesc în mediu în anumite concentraţii, căci în concentraţii mari o substanţă utilă, un aliment, de exemplu, poate funcţiona ca un inhibitor, iar o substanţă nocivă, în concentraţii mici, poate fi indiferentă sau chiar utilă. În mod convenţional, sînt numite antiseptice sau dezinfectante substanţele care, în concentraţii mici, exercită o acţiune nocivă asupra ce-

Scanned with OKEN Scanner

lulei bacteriene. În general, se face o distincție între antiseptice și dezinfectante; se consideră antiseptică sau bacteriostatică o substanță care împiedică exercitarea funcțiunilor esențiale ale celulei și, în special, multiplicarea, dar nu o ucid, iar dezinfectantă sau bactericidă o substanță care distruge definitiv celula.

Diferențierea antisepticelor de dezinfectante este greu de făcut și multe substanțe considerate, inițial, bactericide, nu sînt decît bacteriostatice. Astfel, sublimatul a fost considerat de R. Koch (1881), care a făcut primele cercetări asupra valorii antiseptice a acestui compus al mercurului, ca unul din cei mai puternici dezinfectanți. Mai tîrziu (Geppert, 1889), s-a dovedit că el este un bacteriostatic și că germenii care au stat timp de 1 săptămînă în contact cu antisepticul pot da încă culturi, dacă, prin lichidul în care ei se găsesc, se trece un curent de hidrogen sulfurat care dă cu mercurul o sare insolubilă (sulfura de mercur). Chiar in vivo se poate produce o dezintoxicare a bacteriilor și animalele inoculate cu germeni patogeni tratați cu sublimat mor de infecția respectivă dacă li se administrează grupări sulfnitrilice. Aceste date, precum și altele asemănătoare par a arăta că orice substanță antibacteriană este inițial bacteriostatică, că orice proces de distrugere celulară trece printr-o fază de bacteriostază. Procesul bacteriostatic se transformă în proces bactericid în timp. O acțiune prelungită a bacteriostaticului duce, în cele din urmă, la moartea celulei, la sterilizarea unei culturi. O cultură este considerată sterilă cînd prin metodele cunoscute (însămînțări în medii propice, inoculări la animale) nu se pot pune în evidență în ea elemente vii.

Capacitatea bactericidă a dezinfectantelor, asupra celulei bacteriene, variază în raport cu natura substanței, cu concentrația ei și a bacteriilor din medii și cu o serie de alți factori.

Activitatea unor substanțe dezinfectante este, astfel, în funcție de afinitatea pe care componenții celulari o au pentru ele, deci de puterea absorbantă a celulei. Fixarea dezinfectantului pe substanța celulară poate fi rezultatul unui proces fizic sau chimic; el poate fi deci absorbit de anumiți constituenți celulari (proces fizic) sau poate constitui cu ei diverși compuși (proces chimic).

Capacitatea dezinfectantă a unui produs mai este condiționată și de puterea sa de difuziune în masa celulară, adică de puterea sa de pătrundere în interiorul celulei. Astfel, activitatea dezinfectantă a substanțelor organice ca: alcoolul, aldehida formică, cloroformul etc., este în funcție de gradul lor de solubilizare în componenții celulari. Absorbția, difuziunea, solubilitatea, sînt procese care pregătesc efectul bactericid, care pun în contact dezinfectantul cu substanța vie și ele sînt urmate, mai devreme sau mai tîrziu, de moartea celulei. Mecanismul prin care celula este omorîtă variază de la un produs la altul. Astfel, ionii unor compuși chimici produc moartea celulei prin activitatea lor floculantă asupra coloizilor. Puterea dezinfectantă a acizilor, de exemplu, se datorește capacității lor coagulante și se constată, în acest sens, că un acid este cu atît mai activ, cu cît este un precipitant mai puternic. Alte substanțe dezinfectante (sublimatul) își datoresc activitatea capacității lor de a forma, cu principalii componenți ai celulei, compuși chimici mai mult sau mai puțin ireversibili. Ionii de mercur din sublimat sau alt compus mercuric, de exemplu, pare că se fixează pe grupările sulfhidrice a unor sisteme enzimatice pe care le blochează, împiedicînd astfel metabolismul celular.

Scanned with OKEN Scanner

Activitatea bactericidă a unei substanţe poate fi datorită întregii sale molecule sau ionilor în care ea se disociază. Sublimatul de exemplu este activ prin ionii în care se disociază, iar fenolul, alcoolul, prin întreaga lor moleculă. Ionii de mercur, care se disociază din sublimat, pot acţiona paralel şi sinergic cu ionii de hidrogen şi de aceea sublimatul, în soluţii acide, optimum de pH = 5—6,6, este mai activ ca în soluţii neutre sau alcaline. Sărurile care imobilizează ionii de mercur, cum este clorura de sodiu, slăbesc activitatea dezinfectantă a sublimatului. Compuşii argintului sînt, la fel, cu atît mai activi, cu cît sînt mai disociabili, deci cu cît pun în libertate mai mulţi ioni de argint. Nitratul de argint, de exemplu, este bacteriostatic în diluţie de 1/10 000. Acizii îşi datoresc puterea dezinfectantă atît ionilor de hidrogen cît şi anionilor în care se disociază. Ionii de hidrogen nu sînt egal de activi faţă de toate speciile bacteriene. Astfel, o concentraţie de 0,2% acid sulfuric omoară o suspensie de *Salmonella typhosa* într-o oră, în timp ce bacilul tuberculozei rezistă, la o concentraţie de 15%, 20 de minute sau mai mult.

Activitatea bactericidă a alcalilor se datoreşte concentraţiei de OH pe care ei o creează în mediu şi este deci în funcţie de gradul de disociere a fiecărei substanţe alcaline în parte. Hidratul de sodiu (NaOH) şi hidratul de potasiu (KOH) sînt alcalii cei mai folosiţi în dezinfecţie, ei disociindu-se puternic în soluţii apoase şi fiind, din această cauză, dezinfectanţi foarte activi. Soluţii 1% de NaOH sau KOH distrug formele vegetative ale speciei *Bacillus anthracis* în 5 minute, iar sporii în 10—30 de minute. Activitatea bactericidă a alcalilor nu se exercită, în egală măsură, faţă de toate speciile bacteriene şi bacilul tuberculozei, de exemplu, rezistă 30 de minute în soluţii 4% hidrat de sodiu. Plecîndu-se de la constatările care privesc rezistenţa bacilului tuberculozei în soluţii puternice de acizi sau alcali, s-au instituit metode pentru izolarea acestui germen din materiale patologice infectate cu floră neacido- sau nealcalorezistentă.

Valoarea bactericidă a sărurilor metalelor grele este în funcţie, pe de o parte, de coeficientul de disociere, pe de altă parte de toxicitatea proprie a ionului disociat. Cationii de mercur sînt, astfel, cei mai activi, urmaţi fiind de cei de argint, zinc şi cupru. Anionul cel mai activ este clorul, urmat fiind de NO_3, SO_4 şi de anionii organici. Totuşi, activitatea dezinfectantă cea mai mare o au cationii, apoi anionii şi, în al treilea rînd, moleculele nedisociabile. Halogenii cei mai activi sînt Br şi Cl. Compuşii oxigenaţi ai halogenilor sînt cu atît mai activi, cu cît conţin mai mult oxigen : ClO_4 este mai activ decît ClO_3, iar IO_4 mai activ ca IO_3 etc.

Substanţele dezinfectante pot fi de natură organică sau anorganică. Dezinfectanţii anorganici pot fi împărţiţi în două grupe : substanţe oxidante, care îşi datoresc activitatea oxigenului pe care îl pun în libertate şi care acţionează asupra substanţei vii într-un mod încă necunoscut şi substanţe cu afinităţi pentru albumina celulară, pe care o coagulează sau cu care constituie, prin ionii în care se disociază, compuşi chimici, mai mult sau mai puţin reversibili. In acest grup intră acizii, alcaliile şi sărurile metalelor grele.

Oxigenul atomic pus în libertate de diverse substanţe oxidante ca hipermanganatul de potasiu, apa oxigenată etc. este nociv pentru toate bacteriile. Oxigenul molecular din atmosferă nu este însă nociv decît pentru anumite bacterii şi anume pentru cele anaerobe, cele aerobe avînd chiar

Scanned with OKEN Scanner

nevoie de acest gaz. O micşorare a concentraţiei de oxigen din spaţiul în care se găsesc bacteriile înlesneşte multiplicarea anaerobilor, dar o inhibă, total sau parţial, pe a aerobilor obligaţi sau facultativi. Astfel, *Bacillus mycoides, B. megatherium, B. prodigiosus,* aerobi obligaţi, sînt total inhibaţi prin reducerea presiunii la 15—20 mm mercur (P a l i i, 1952). *Escherichia coli* se dezvoltă la o presiune redusă de oxigen, dar coloniile pe agar sînt de 10—15 ori mai mici ca cele care se dezvoltă, pe acelaşi mediu, însă într-o atmosferă avînd o concentraţie normală de oxigen.

Aerobii obligaţi suportă în condiţii perfecte oxigenul, în concentraţia în care el se găseşte în atmosferă, 1/5. O creştere a acestei concentraţii le alterează fiziologia şi le inhibă multiplicarea. Bacilul difteriei, de exemplu, nu se dezvoltă într-o atmosferă de oxigen pur, iar *Bacillus anthracis, Vibrio cholerae* sînt inhibaţi chiar la o concentraţie de 40% oxigen.

Dezinfectanţii organici sînt foarte numeroşi. Unii dintre ei se pare că îşi datoresc activitatea capacităţii lor de a solubiliza lipidele. Nu s-a putut însă preciza în ce măsură această proprietate este determinantă pentru puterea lor bactericidă. Un dezinfectant organic este alcoolul etilic. Diluţia sa cea mai activă este de 50—70% şi ea corespunde celei mai ridicate capacităţi coagulante a albuminei. O asemenea concentraţie omoară formele vegetative în 10—15 minute, dar nu are acţiune nocivă asupra sporilor. Dezinfectanţi organici importanţi conţine seria aromatică din care fac parte, în primul rînd, acidul fenic şi derivaţii săi, crezolul, lizolul, rezorcinolul etc. Mecanismul acţiunii nocive a fenolului nu este încă complet lămurit. Se pare că el acţionează prin solubilizarea sa în mediul celular şi prin inhibarea consecutivă a unor fermenţi. Este sigur că nu floculează coloizii celulari, însă se pare că are asupra lor o acţiune dezhidratantă. Acţionînd prin simplă solubilizare, efectul bactericid este condiţionat de modul de distribuire a substanţei între mediul extern şi mediul celular. R. K o c h a observat, încă din 1881, că soluţiile apoase de fenol sînt mai active ca cele în ulei sau alcool, ceea ce s-ar explica prin modul de distribuire a substanţei active. Fenolul se distribuie mai mult în ulei sau alcool decît în mediul celular şi pentru acest motiv aceste soluţii sînt puţin active; dimpotrivă, el este mai solubil în mediul celular decît în apă şi de aceea soluţiile apoase sînt mai active ca cele în ulei sau alcool. Activitatea bactericidă a fenolului se accentuează în prezenţa clorurii de sodiu, ceea ce se explică, de asemenea, prin schimbarea factorului de distribuire între apă şi materia celulară. Fenolul, în soluţie apoasă 5%, omoară repede formele vegetative, dar mai încet sporii. Soluţiile 1/1 000 sînt bacteriostatice, dar nu bactericide.

Un grup important de dezinfectanţi organici îl constituie compuşii organici ai mercurului (mertiolatul de sodiu — etilmercuritiosalicilat de sodiu, metafenol-4-nitro-5-hidroxi-mercuriortocrezol, mercurocromul — dibromoxi-mercurifluorescein etc.) şi argintului (protargolul, argirolul etc.). Aceşti compuşi sînt activi faţă de bacterii, dar prezintă avantajul că, în comparaţie cu compuşii anorganici ai acestor metale, ei sînt mai puţin toxici pentru celulele animale. Dintre aceşti compuşi organici, mertiolatul de sodiu are, în prezent, cele mai largi utilizări, ceea ce se datoreşte marii sale activităţi bactericide şi slabei sale toxicităţi pentru ţesuturile animale. Astfel, el reuşeşte să menţină steril un produs — ser, vaccin — în diluţie de 1/10 000—1/20 000 şi omoară culturile de *Salmonella typhosa* în concentraţie de 1/3 000, iar pe cele de stafilococ, în concentraţie de 1/4 000. Toxici-

Scanned with OKEN Scanner

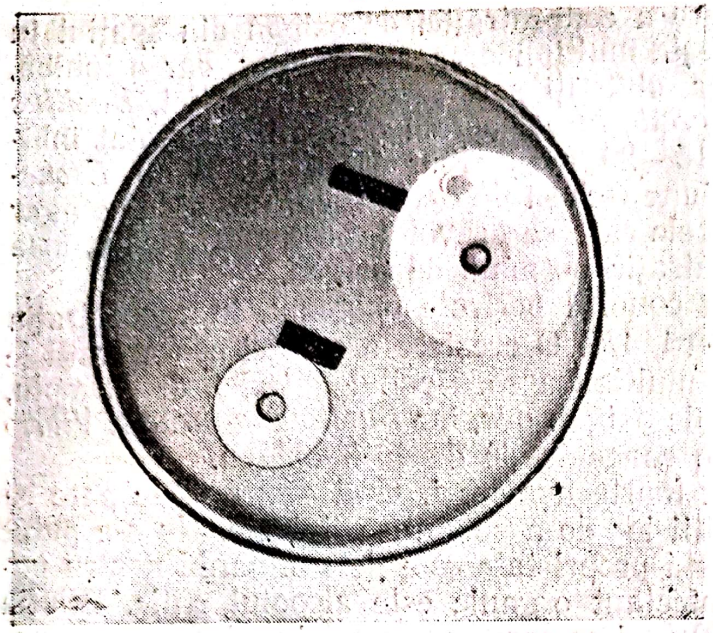


Fig. 15 — Titrarea mertiolatului de sodiu prin metoda difuzimetriei liniare (după **Pascu L.** și col.)
În jurul antisepticului se produce o zonă largă de inhibiție a germenului (stafilococ)

tatea sa pentru iepure este de 25 mg/kg corp, iar pentru șoarece de 35 mg/kg corp. Cobaii, injectați subcutanat, cu doze relativ mari — 2 ml dintr-o soluție de 1/500 — fac reacții inflamatorii locale, care pot sfîrși prin necroză și escară (Eșanu și col., 1955). Omul este rezistent și inocularea pe cale intravenoasă a unei doze de 500 ml dintr-o soluție 1% nu produce tulburări.

Mertiolatul de sodiu, deși este un bactericid activ, nu are, în general, proprietăți virulicide și poate fi folosit pentru distrugerea bacteriilor din produse patologice care conțin și diverse virusuri. Astfel, în laborator el se utilizează pentru distrugerea bacteriilor din culturi lizate prin bacteriofag. În concentrații de 1/20 000—1/25 000, mertiolatul de sodiu distruge bacteriile, dar nu are nici o acțiune atenuantă asupra virusului bacteriofag.

Mertiolatul de sodiu este stabil și nu-și modifică proprietățile prin încălzire la 120°C. Activitatea sa bactericidă se datorește blocării reversibile a unor sisteme enzimatice din celulele bacteriene și această blocare poate fi neutralizată, atît in vivo cît și in vitro, prin compuși sulfhidrici — cisteina, dimercaptopropanolul etc. O altă grupă de substanțe cu largi utilizări în laboratoarele de bacteriologie este cea a substanțelor colorante. Activitatea lor bactericidă este însă selectivă, în sensul că se exercită numai asupra unor specii bacteriene. Astfel, verdele de malahit inhibă dezvoltarea speciei *Bacillus subtilis* în diluție de 1/4 000 000, stafilococii în diluție de 1/1 000 000, colibacilul și salmonelele în diluție de 1/30 000—1/40 000, dar, față de bacilii acidorezistenți, el este practic inactiv și de aceea se folosește în prepararea mediilor cu ou pe care se cultivă bacilul tuberculozei. Modul diferit de comportare a diverselor substanțe colorante față de diverse specii bacteriene se folosește și pentru identificarea unor specii bacteriene. Astfel, speciile din genul *Brucella* se disting între ele și prin modul cum se comportă față de o serie de substanțe colorante.

Săpunurile sînt dezinfectante mult folosite, și ele își datoresc activitatea dezinfectantă, pe de o parte conținutului lor în săruri ale acizilor grași, iar pe de altă parte excesului de alcali.

Dezinfectanții se folosesc pentru dezinfecția spațiilor care pot fi ermetic închise și sub forma gazoasă ; sub această formă se întrebuințează mai

Scanned with OKEN Scanner

cu seamă formolul şi bioxidul de sulf. Acţiunea lor destructivă este condiţionată de un grad mare de umiditate — 60% şi mai mult — ceea ce înseamnă că ei formează, împreună cu apa, produsul activ.

METODE PENTRU DETERMINAREA VALORII ANTIBACTERIENE A UNEI SUBSTANŢE

Dat fiind că valoarea antibacteriană a unei substanţe este condiţionată de o serie de factori, această valoare nu poate fi exprimată decît în comparaţie cu o altă substanţă. Antisepticul de comparaţie este, în general fenolul, recomandat de Rideal şi Walker (1900) şi valoarea unui antiseptic necunoscut încă este exprimată prin aşa-numitul indice sau coeficient fenolic. Acest coeficient ne arată că o substanţă este un antiseptic mai bun sau mai slab decît fenolul, după cum valoarea sa este superioară sau inferioară cifrei 1. Pentru a afla acest indice se procedează în felul următor: se determină, în condiţii egale de lucru şi pentru aceeaşi specie bacteriană, diluţia maximă de fenol şi de substanţă necunoscută care ucide o suspensie bacteriană dată în 10 minute, dar nu în 5 minute. Cele două cifre se divid una prin alta şi anume cifra diluţiei substanţei necunoscute cu cifra diluţiei active de fenol şi cifra obţinută, prin această împărţire, reprezintă coeficientul fenolic. De exemplu, *Staphylococcus aureus,* tulpina Oxford, este distrus în condiţiile arătate mai sus de o diluţie de fenol 1/55, iar de mertiolatul de sodiu în diluţie de 1/1 760 (Eşanu şi col.). Împărţind pe 1 760 prin 55 se obţine cifra 32, ceea ce înseamnă că pentru stafilococul folosit mertiolatul de sodiu este de 32 de ori mai activ decît fenolul. Asemenea exemple se pot vedea şi în Poliakov (1950).

Acest procedeu însă nu dă valoarea absolută a dezinfectantului, ci una foarte relativă. Pentru a obţine o cifră care să exprime mai precis valoarea unui antiseptic, în diferitele concentraţii, şi să arate în acelaşi timp şi viteza cu care procesul bactericid se petrece, se recurge la următoarea formulă (Watson şi Chick):

$$K = C^n t$$

în care:

C = concentraţia dezinfectantului;
n = o constantă caracteristică fiecărui dezinfectant;
t = timpul de distrugere a bacteriei.

Valorile lui C şi t se află prin metode obişnuite şi, aplicînd logaritmii, ecuaţia poate fi rezolvată găsind pentru K valori care exprimă mai precis valoarea dezinfectantă comparativă a diverselor substanţe chimice.

Determinarea indicelui fenolic trebuie să se facă ţinînd seama de anumiţi factori care pot influenţa procesul de dezinfecţie. Acest proces este influenţat în special de compoziţia mediului în care se găsesc suspendaţi germenii, de concentraţia germenilor şi a dezinfectantului în mediu şi de timpul de contact.

In consecinţă, cercetarea unui nou antiseptic trebuie făcută într-un anumit mediu, la un anumit pH, cu o anumită concentraţie de germeni, aşa cum se vede în tabelul 16.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 16

Metodele standard de determinare a indicelui fenolic (după Zinsser)

	Metoda F. D. A.	Metoda Rideal-Walker	Metoda H. L. a lui Anderson şi Mc Clintic
Compoziţia mediului	Extract Liebig 5g Peptonă 10g Sare 5 g Apă 1 000 ml Fierbere 20min	Extract Liebig 10g Peptonă 20g Sare 10 g Apă 1 000 ml Fierbere 20 min	Extract Liebig 3 g Peptonă 10 g Sare 5 g Apă 1 000ml Fierbere 15 min
pH	6,8	Neprecizat	6 — 7
Cantitatea de cultură adăugată la un volum egal de dezinfectant diluat în diferite proporţii (în ml)	0,5 — 5	0,5—5	10
Cantitatea de fenol care omoară în 10 minute, dar nu în 5 minute	1/90	1/90—1/110	Neprecizat
Tubul acoperit	Vată	Vată	Neacoperit
Temperatura de lucru (în grade Celsius)	20	15 — 18	20
Intervalul la care se face trecerea pe medii pentru controlul dezinfecţiei	5; 10; 15 min	2,5; 5; 7,5; 10 min.	5; 7,5; 10; 12,5; 15 min
Mărimea picăturii însămînţate	Ansă 4 mm sau nr. 23 B	Ansă 4 mm sau nr. 27	Ansă în spirală
Modul de calculare a indicelui fenolic	Cea mai mare diluţie care nu omoară în 5, dar omoară în 10 minute, împărţită prin diluţia respectivă de fenol	Cea mai mare diluţie care nu omoară în 5, dar omoară în 7,5 minute, împărţită prin diluţia respectivă de fenol	Media aritmetică a celei mai mari diluţii care nu permite creşterea în 5; 10 şi 15 minute, împărţită prin diluţia respectivă de fenol

ACŢIUNEA AUTOFERMENŢILOR ASUPRA BACTERIILOR. AUTOLIZA

Celulele bacteriene, chiar în culturi pure, suferă procese de autoliză, de dezintegrare. Asemenea procese au putut fi puse în evidenţă atît microscopic, cît şi prin examenul mediilor de cultură. La microscop, mai ales la microscopul electronic, se găsesc, în culturile vechi, celule distruse, resturi celulare, membrane zdrenţuite, iar în lichidele de cultură se identifică, pe cale chimică, unii componenţi somatici ai celulei. Autoliza se produce sub influenţa fermenţilor proprii.

Scanned with OKEN Scanner

Procesul de autoliză este mai evident în culturile vechi, dar el poate fi provocat, în condiţii experimentale, şi în culturile tinere. În acest din urmă caz el este total, adică cuprinde întreaga masă celulară. Astfel, pentru a dezintegra bacilii tuberculozei, în scopul obţinerii unei soluţii cît mai bogate în principii revelatori, se tratează culturile cu toluol, în concentraţii care omoară celulele, dar care nu au nici o influenţă nocivă asupra fermenţilor. Aceştia din urmă atacă celulele moarte, le dezintegrează, punîndu-se, astfel, în libertate diversele molecule constituente ale celulei. În condiţii similare, culturile de pneumococ se lizează în prezenţa cloroformului (Burgens şi col., 1912) sau bilei (Goebel şi Avery, 1929). Dezintegrarea pneumococilor nu este urmată, în aceste cazuri, de o desfacere a proteinelor care constituie celulele, deoarece fermenţii preoteolitici sînt inhibaţi. Liza, aşa cum reiese din aceste date, nu se datoreşte fermenţilor proteolitici. Sturdza, (1938), Criss şi Biriuzova (1950) au examinat o serie de substanţe şi au găsit că, pe lîngă toluol şi cloroform, se găsesc şi alţi compuşi chimici, cum este alcoolul de 96°, care pot avea o acţiune asemănătoare, adică omoară celula, dar nu inactivează fermenţii. Aceste substanţe pot fi, la fel, folosite pentru a provoca procese de autoliză. Mai mult încă, autorii arată, în 1951, că chiar formolul poate avea o acţiune asemănătoare, cu condiţia ca antisepticul să fie eliminat din soluţie după omorîrea celulelor şi să nu fie adăugat suspensiei în concentraţii prea mari. Eliminarea formolului se face prin dializă sau centrifugare. Tehnica de lucru folosită de cercetători pentru a elimina formolul prin dializă este foarte ingenioasă. Ei amestecă suspensia bacteriană *(Bacillus mycoides)* cu concentraţii diferite de formol şi, după un timp variabil de contact, pun o picătură din suspensie pe o membrană foarte fină de colodiu care este întinsă pe suprafaţa apei dintr-o placă Petri. Membrana de colodiu se confecţionează punînd pe suprafaţa apei o picătură dintr-o soluţie de colodiu în acetat de amil.

În aceste condiţii, formolul difuzează din lichidul picăturii şi fermenţii încep acţiunea lor dezintegrantă. În scopul de a urmări şi verifica procesul de autoliză, autorii examinează porţiunea de membrană de colodiu cu picătura de cultură la microscopul electronic, punînd în evidenţă diversele faze ale procesului de dezintegrare celulară.

CONSERVAREA BACTERIILOR. LIOFILIZAREA

Conservarea vitalităţii şi mai ales a caracterelor tulpinilor bacteriene a preocupat pe cercetători, dat fiind că bacteriile, în special cele asporogene, pierd din calităţile lor iniţiale prin transplantări pe mediile de cultură. În general, bacteriile se conservă mai bine la temperaturi scăzute, cînd metabolismul este redus, decît la temperaturi apropiate de punctul optim de multiplicare, cînd metabolismul se apropie de maximum caracteristic speciei. La această regulă sînt şi excepţii ; astfel culturile de *Pasteurella animalium* se conservă un timp mai îndelungat la temperatura camerei decît la rece, 2—6°C.

Conservarea la temperaturi scăzute nu dă totdeauna deplină satisfacţie, în sensul că ea durează, de multe ori, puţin şi deci transplantarea trebuie să se facă frecvent. În plus, ea nu asigură totdeauna păstrarea tuturor proprietăţilor unei tulpini. Pentru a remedia aceste inconveniente, s-a recurs

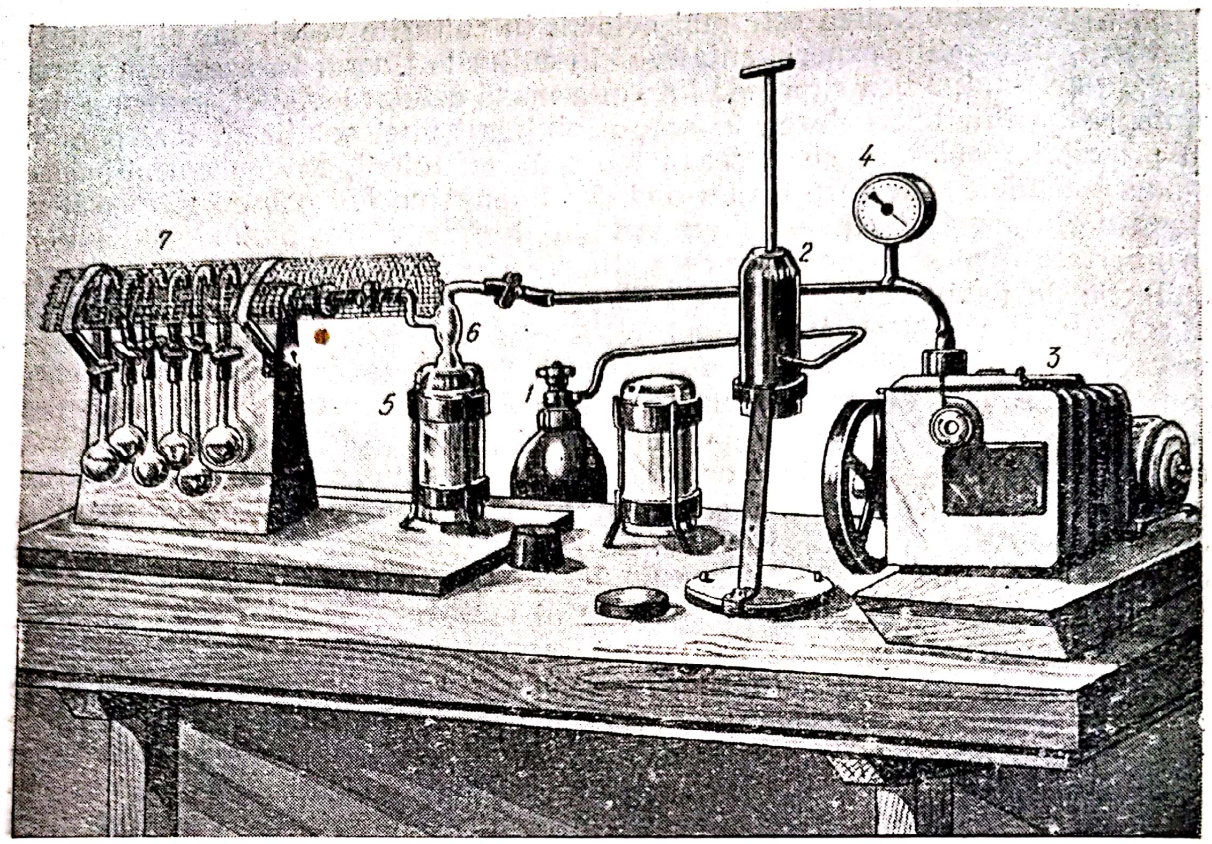


Fig. 16 — Liofilizatorul construit de Ţaga M. la I.P.I.A.
1 — tub cu bioxid de carbon la o presiune de 40 at; 2 — piston pentru prepararea gheţei carbon; 3 — pompă de vid; 4 — vacuumetru; 5 — vas cu amestec de ghiaţă carbonică şi alcool pentru condensarea vaporilor şi apă; 6 — condesatorul de vapori; 7 — puşcă cilindrică care poartă tuburile de care se prind fiolele cu suspensia de liofilizat

la alte procedee. Uscarea pe fire de mătase, de exemplu, a satisfăcut pe unii cercetători. Se observă, într-adevăr, că pe firele de mătase, îmbibate cu sînge sau alt material virulent şi păstrate deasupra clorurii de calciu, deci într-o atmosferă uscată, lipsită de vapori de apă, streptococii rămîn vii şi virulenţi, chiar după o conservare de 16 luni.

Vaporii de apă sînt un factor atenuant şi destructiv de prim ordin, urmaţi fiind de oxigen şi căldură. De aceea, înlăturînd contactul bacteriilor cu vapori de apă, oxigen şi temperaturi ridicate se asigură conservarea lor pentru mult timp. Acest principiu de conservare s-a aplicat, cu deplin succes, întîi virusurilor filtrabile, de către Hartley (1936) şi apoi şi bacteriilor. Pentru a realiza acest fel de conservare se procedează în felul următor: suspensiile dense de bacterii se centrifughează şi se spală de cîteva ori; la ultima suspensie bacteriană se poate adăuga gumă arabică în proporţie de 1/10. Amestecul se repartizează în fiole, în fiecare fiolă punîndu-se cîte 1 ml; fiecare fiolă se scufundă, pentru congelare, într-un amestec refrigerent, la o temperatură scăzută (— 40°C) — gheaţă carbonică şi alcool etilic. Amestecul îngheaţă în cîteva minute. Apoi fiola este pusă în legătură cu un aparat de vid; desicaţia este completă după cîteva ore de funcţionare a pompei de vid.

Suspensia de germeni din fiolă rămîne, în tot acest timp, îngheţată, din cauză că evaporarea lichidului necesită o cantitate de căldură; mai mult

încă, atît timp cît în fiolă mai este apă sub formă de gheaţă, care se evaporă, se constituie în jurul fiolei, pe dinafară, în partea care conţine apa, un manşon de gheaţă. Cînd apa din fiolă s-a evaporat în întregime, manşonul de gheaţă, dinafara fiolei, se topeşte, ceea ce constituie un indiciu că uscarea s-a terminat. Masa de germeni, la sfîrşitul operaţiei, se prezintă ca o peliculă fină şi fragilă pe fundul fiolei. În această peliculă, germenii îşi conservă vitalitatea şi virulenţa, la temperatura camerei sau la 5°C, timp îndelungat. Bacilul morvei se conservă, de exemplu, în aceste condiţii, timp de 8—9 luni.

Pe principiul expus mai sus, s-au construit aparate speciale, numite liofilizatoare, cu ajutorul cărora se pot îngheţa şi usca în vid cantităţi mai mici sau mai mari de suspensii bacteriene, plasma sanguină umană şi alte produse alterabile prin oxigen şi vapori de apă. Operaţia de îngheţare şi uscare în vid se numeşte liofilizare.

O metodă mai simplă, care nu necesită un refrigerent puternic, este următoarea: suspensii dense de bacterii se repartizează în tuburi, cîte 0,5—1 ml în fiecare tub, se usucă în vacuum cît mai repede posibil şi apoi se scoate aerul din tub cu o pompă de vid. Tubul, după efectuarea vidului, se închide la flacără.

Scanned with OKEN Scanner

PROCESE DE VARIAȚIE LA BACTERII

Ceea ce ne izbește, atunci cînd privim viețuitoarele care ne înconjoară, este imensul lor număr și extrema lor bogăție de forme ; din aceste cauze studiul viețuitoarelor nu se poate face fără o prealabilă sistematizare, clasificare, grupare a lor după afinitățile morfologice, fiziologice sau biologice. O asemenea clasificare bazată exclusiv pe criterii morfologice a fost inițiată de L i n n é în secolul al XVIII-lea și de atunci ea a fost lărgită mereu, pentru a putea cuprinde toate formele de viață ce erau descoperite prin cercetări.

Viețuitoarele de pe planeta noastră sînt împărțite, convențional, întîi în două regnuri, vegetal și animal, sau chiar trei regnuri; dacă socotim că microbii constituie un regn. Fiecare regn este împărțit la rîndul său în încrengături, clase, ordine, familii, genuri și specii. Specia este ultimul termen al clasificației. Ea grupează toți indivizii calitativ identici, adică au aceeași formă, aceleași însușiri fiziologice și, de regulă, calitativ, aceeași compoziție chimică. Specia, spre deosebire de gen, familie, ordin etc., este o categorie naturală și nu una creată de oameni în vederea ușurării studiului. Criteriul morfologic, în definirea speciei bacteriene, este, de multe ori, de mică importanță, în timp ce criteriile fiziologice și culturale au un rol predominant.

O specie bacteriană, ca și o specie animală sau vegetală, se definește prin diversele ei proprietăți. Astfel, specia *Bacillus anthracis* se definește prin forma, dimensiunile, afinitățile tinctoriale, compoziția chimică, caracterele culturale, fiziologice și de patogenitate. Orice germen care se izolează din natură și care prezintă însușirile speciei *B. anthracis,* astfel cum este descrisă de diverși cercetători și înregistrată în determinatoare, aparține acestei specii.

Cercetarea unor însușiri bacteriene, cum sînt cele fiziologice sau de patogenitate, nu se poate face pe indivizi, deoarece o singură celulă, de multe ori, nu produce fenomenul caracteristic speciei. Astfel, un singur bacil al cărbunelui nu omoară regulat nici chiar șoarecele și dacă s-ar inocula o singură celulă la un șoarece am putea ajunge la concluzia că germenul este nevirulent. Inoculînd însă mai mulți germeni, se poate produce constant efectul patogen. De aici necesitatea de a examina unele însușiri, pe populații de indivizi, pe culturi provenind dintr-o tulpină. Ce este o cultură și ce este o tulpină ? Tulpina cuprinde germeni dintr-o specie, care

au aceeaşi origine. De exemplu, făcînd însămînţări din cadavrul unei vaci moarte de antrax, în medii se va dezvolta *Bacillus anthracis*. In mediu avem deci o cultură de *B. anthracis*. Cultura obţinută de la această vacă constituie o tulpină şi ea se notează cu un număr sau cu numele localităţii de unde provine vaca, cu numele vacii sau cu o altă indicaţie care permite distingerea acestei tulpini de alte tulpini de *B. anthracis*, izolate de la alte animale.

Culturile izolate din diversele organe ale aceluiaşi animal nu constituie fiecare din ele o tulpină, ci simple culturi ale aceleiaşi tulpini. Astfel, din cadavrul unei vaci se pot face însămînţări din cord, splină, ficat, rinichi, creier şi din toate aceste organe se obţine cîte o cultură. Toate aceste culturi aparţin însă unei singure tulpini, deoarece, de regulă generală, germenii diverselor culturi obţinute de la acelaşi animal sînt identici ca patogenitate, însuşiri fiziologice etc.

Cercetarea proprietăţilor fiziologice şi de patogenitate se face asupra germenilor care se găsesc într-un tub cu bulion sau cu agar. Rezultatele obţinute sînt valabile numai în cazul cînd cultura a fost pură, adică atunci cînd în tub nu s-au găsit, de exemplu, decît celule aparţinînd speciei *B. anthracis*.

Specia *B. anthracis* este constituită dintr-o serie de tulpini, care se găsesc în diverse laboratoare din lume, precum şi din sporii care sînt răspîndiţi în pămînt, în cele mai diverse regiuni ale planetei. Ea este constituită deci dintr-un număr imens de indivizi, dacă ţinem seama, mai ales, că în fiecare tub de agar se găsesc cîteva miliarde de celule. Tulpinile de *B. anthracis*, care se găsesc în diversele laboratoare sau chiar în acelaşi laborator, nu sînt toate identice, pentru că, adeseori, întreţinerea lor pe medii artificiale le modifică unele proprietăţi caracteristice. Astfel, *B. anthracis*, izolat din cadavrele animalelor moarte de antrax, este un germen virulent şi capabil să capsuleze ori de cîte ori este introdus în organismul unui animal receptiv. Există însă şi tulpini care au pierdut aceste însuşiri, care sînt avirulente şi acapsulogene. La fel, *B. anthracis* formează pe agar colonii plate cu marginile neregulate, cu suprafaţa aspră şi constituite din bacili necapsulaţi. Există însă şi tulpini care constituie pe agar colonii bombate, cu marginile regulate, cu suprafaţa lucitoare şi care conţin, chiar pe acest mediu, bacili capsulaţi. Acest fel de tulpini care, în raport cu tulpinile tip ale speciei, pierd sau cîştigă unul sau mai multe caractere se numesc *variante* sau *tipuri* ale speciei respective. Tulpinile care au pierdut, de exemplu, virulenţa şi proprietatea capsulogenetică constituie o variantă sau un tip al speciei *B. anthracis*. La fel, tulpinile care formează pe agar colonii mucogene cu bacili capsulaţi sînt o variantă sau un tip al aceleiaşi specii. Variante sau tipuri s-au descris la toate speciile bacteriene. Speciile mobile, deci ciliate, au variante imobile — neciliate; speciile capsulate au variante acapsulate; speciile care dau pe agar colonii netede au variante care dau colonii aspre; speciile patogene au variante apatogene etc.

VARIANTELE S ŞI R

Unele variaţii sînt caracteristice unei singure sau unui grup restrîns de specii bacteriene — aşa este, de exemplu, însuşirea de a da colonii bombate cu germeni capsulaţi la *Bacillus anthracis* — altele, dimpotrivă, le

întîlnim, sub aceeaşi formă, la un şir întreg de specii. Astfel, variantele numite S (netede) şi R (aspre) le întîlnim la numeroase specii de bacterii Gram negative sau Gram pozitive. Numele de S şi R, respectiv smooth (neted) şi rough (aspru), în limba engleză, exprimă aspectul coloniilor pe agar. Variantele S dau pe agar colonii netede şi variantele R colonii as-

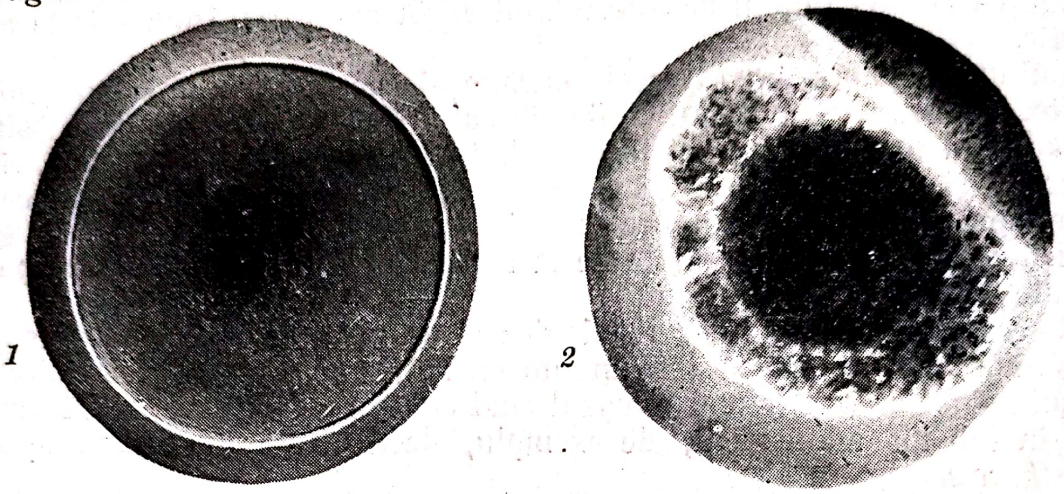


Fig 17 — Colonie S (1) şi colonie R (2) la *Pseudomonas punctata*
Imagini microscopice (ob.3)

pre. Ceea ce a atras, îndeosebi, atenţia cercetătorilor este faptul că aspectul cultural la aceste variante este legat de o serie întreagă de proprietăţi morfologice, culturale, fiziologice şi de patogenitate. În consecinţă şi în acest caz, cînd tulpina se transformă din S (forma socotită normală) în R (forma care apare, de regulă, pe medii artificiale), ea îşi modifică nu numai aspec-

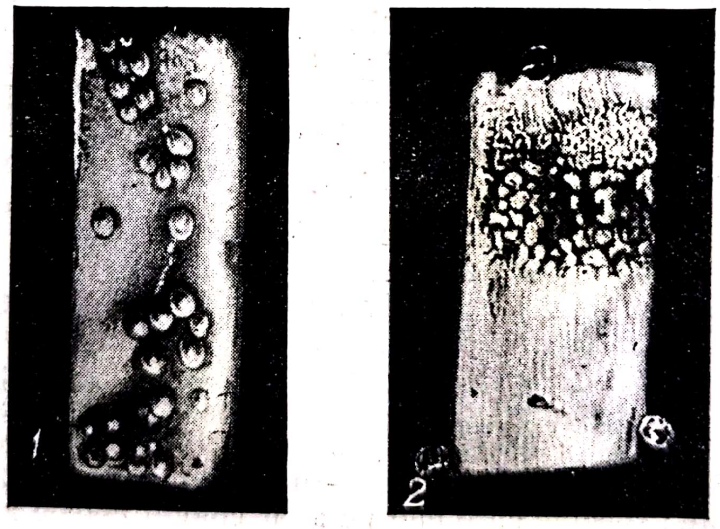


Fig. 18 — Colonii S (1) şi colonii R (2) de *Bacillus tuberculosis*, tip aviar
Cultură de pe cartof

tul cultural, aşa cum exprimă literele S şi R, dar şi alte proprietăţi biologice importante. Aceste cauze au făcut ca variantele S şi R să fie studiate la diverse specii. Dăm în tabelul 17 caracterele lor distinctive principale.

Tabelul 17

Caracterele distinctive principale ale variantelor S şi R[1]

Varianta S	Varianta R
1. Tulbură uniform bulionul	1. Cultură aglutinată
2. Suspensie stabilă în soluţie de 0,8% Cl Na şi neaglutinată de tripaflavină	2. Suspensia aglutinează în soluţia de 0,8% Cl Na. Suspensiile neaglutinate de soluţia 0,8% Cl Na se aglutinează în prezenţa tripaflavinei
3. Colonii netede, regulate, convexe, opace	3. Colonii aspre, cu marginile neregulate, dinţate sau ondulate, suprafaţa prezentînd nervuri care au fost apropiate de cele ce se găsesc pe frunza de viţă de vie
4. La speciile capsulate, celulele acestei forme au capsulă	4. Capsula este absentă la speciile obişnuit capsulate
5. Produc substanţe solubile specifice. Speciile Gram negative conţin complexul glucido-lipido-polipeptidic	5. Nu secretă substanţe solubile specifice. Speciile Gram negative nu conţin în celula lor complexul glucido-lipido-polipeptidic, însă conţin fracţiunea proteică toxică
6. La speciile patogene, varianta este virulentă sau toxică	6. Varianta este de regulă puţin patogenă sau apatogenă
7. Se izolează din infecţii acute	7. Se izolează, de regulă de la purtători sau convalescenţi; se disociază din forma S pe mediile de cultură
8. Reprezintă forma obişnuită a speciei	8. O variantă de adaptare
9. Morfologia obişnuită fiecărei specii	9. Tinde către forma rotundă

[1] Formele S şi R tipice şi avînd caracterele din acest tabel se întîlnesc la bacteriile Gram negative. La cele Gram pozitive deosebirile între formele S şi R nu sînt totdeauna aşa de nete ca la bacteriile Gram negative. De exemplu, bacilul tuberculozei de tip uman se izolează de regulă, din produsele patologice sub forma R şi aceasta este forma sa virulentă. De asemenea, *Bacillus anthracis* virulent se prezintă sub forma R, forma sa S fiind puţin patogenă.

Formele R se disjung din formele S în cele mai variate condiţii şi sub influenţa celor mai diverşi factori. Ele pot apărea în organism sau în afara lui, pe medii lichide sau solide, brusc sau treptat, prezentînd, în acest din urmă caz, numeroase forme intermediare.

Scanned with OKEN Scanner

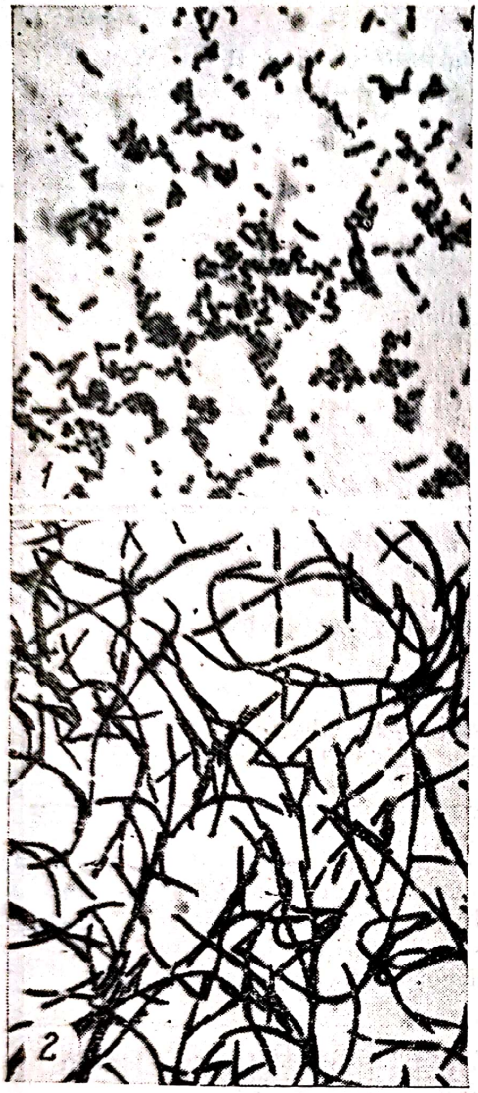


Fig. 19 — Bacterium mallei din colonii S (1) și din colonii R (2) (după **Munțiu**)

Apariția formelor R din formele S a putut fi urmărită mai îndeaproape pe agar. Bacilul rujetului, de exemplu, cultivat pe agar în plăci Petri dă colonii mici, rotunde, cu suprafața și marginile netede. Examinînd mai multe colonii, se poate observa, la unele tulpini, că din marginea unor colonii netede se desprinde și crește ca un evantai o formă nouă care se dezvoltă ca o plantă, avînd rădăcinile înfipte în colonia primară. Transplantînd germenii din această zonă de neoformație, se obțin, mai departe, colonii mari, plate cu marginile neregulate, cu suprafața striată, aspră, deci colonii R. Germenii conținuți de asemenea colonii de bacili ai rujetului sînt instabili; ei au tendința de a se disocia mereu și a da din nou formele S din care provin.

Această revenire la forma S se manifestă mai energic in vivo, în organismul animal.

Procese asemănătoare s-au descris și la alte specii. *Klebsiella pneumoniae* dă, de regulă, pe agar colonii rotunde, mucoase. La marginea unor asemenea colonii apar însă, la fel ca la bacilul rujetului, formații în evantai care sînt constituite din forme R și care sînt de altfel instabile (T o n n i e s s e n, 1913) M. S t e r n e (1937) face observații similare la *Bacillus anthracis* cultivat într-o atmosferă de CO_2 și pe agar cu ser: bacilul formează colonii mucoase cu germeni capsulați. Aceste colonii însă nu întîrzie să dea naștere la colonii aspre de tip R care se desprind din colonia mucoasă și se întind pe mediu, fugind parcă din carapacea coloniei inițiale.

Capacitatea de variație a bacteriilor este enormă. Procesul de variație este înlesnit de o serie de factori, în primul rînd, de simplitatea structurii bacteriilor, în al doilea rînd, de numărul imens de indivizi care constituie diversele specii. Intr-adevăr, este de remarcat, cu privire la cel de al doilea factor, că variațiile se pot întîlni mai ușor la o specie care numără miliarde de miliarde de indivizi, decît la una la care numărul indivizilor este redus.

Procesul de variație este astăzi unanim acceptat și această acceptare se sprijină pe un material documentar de o extremă bogăție. Intr-adevăr, nici un capitol al bacteriologiei nu a fost dezbătut atît de mult ca cel al capacității de variație a bacteriilor. Această dezbatere a fost cu atît mai aprinsă cu cît, încă de la începutul bacteriologiei, s-au desemnat două cu-

rente contrarii : curentul monomorfist susținut de școala lui F. Cohn și R. Koch și curentul pleomorfist, inițiat de Nägeli.

Inițial (1876—1890), școala lui Cohn și Koch, care susținea invariabilitatea speciilor, domina bacteriologia. Variațiile semnalate de unii cercetători erau datorite, după această școală, culturilor impure, cu care adeseori se lucra în acel timp cînd tehnica izolării culturilor în stare pură era stăpînită de puțini bacteriologi, iar formele care se abăteau de la tipul obișnuit și care nu puteau fi atribuite impurității culturilor erau socotite de natură degenerativă și teratologică. Acest exclusivism a avut părțile lui pozitive, în sensul că a încetățenit, printre bacteriologi, necesitatea de a lucra cu culturi pure și a permis adunarea datelor pe care mai tîrziu s-a putut clădi o clasificație a bacteriilor, clasificație pe care școala pleomorfistă a lui Nägeli o socotea imposibilă, deoarece, după ea, nestabilitatea totală a oricărei însușiri era caracteristica esențială a acestor viețuitoare. Monomorfismul însă a fost mai tîrziu învins și însuși Koch capătă convingerea că forma și însușirile fiziologice ale bacteriilor sînt supuse la însemnate variații.

În concluzie, bacteriile, ca și celelalte viețuitoare, și chiar mai mult decît ele, își modifică caracterele sub influența factorilor de mediu. Aceste modificări privesc cele mai diverse însușiri și se fac sub influența celor mai feluriți factori. Existența a numeroase variante bacteriene și dependența totală a bacteriilor de factorii de mediu confirmă, încă o dată teza miciurinistă a unității indisolubile dintre viețuitoare și mediul în care ele se dezvoltă.

VARIAȚII PRIVIND DIMENSIUNILE ȘI FORMA

Modificările de formă ale unei celule bacteriene sînt, de cele mai multe ori, trecătoare. Într-adevăr, într-o cultură veche se poate întîlni, mai ales la unele specii, o mare variabilitate de aspecte, dar formele anormale, numite încă și heteromorfe, revin uneori la forma obișnuită, atunci cînd ele sînt încă vii și sînt trecute pe un mediu proaspăt. Acest polimorfism bacterian este, în mod particular, favorizat de prezența în mediu a unor săruri cum sînt clorurile de litiu sau magneziu. La fel, unele substanțe bacteriostatice, ca sulfamida și mai ales penicilina, provoacă apariția formelor bacteriene anormale, dar care nu sînt stabile și dispar o dată cu cauza care le-a provocat. Unele specii prezintă o mare variație de forme chiar pe mediile obișnuite. Citățm, drept exemplu, agentul necrobacilozei — *Actinomyces necrophorus.*

Școala monomorfistă reprezentată prin Cohn, Koch și alții considera formele anormale, apărute în diverse condiții de mediu, ca expresia unor fenomene de degenerare celulară. S-a putut însă constata că, de multe ori, aceste forme au o vitalitate tot așa de mare ca și cele obișnuite, ceea ce, desigur, nu s-ar fi putut întîmpla dacă ele erau forme teratologice sau de degenerare celulară. Unii autori constată, în același sens, că formele mari globulare, care iau naștere în mediile cu o concentrație mare de săruri, se colorează Gram pozitiv chiar dacă aparțin unor specii Gram negative. Reținerea culorii Gram ar fi datorită, după acești cercetă-

tori, faptului că materia celulară este într-o stare de densitate mai ridicată ca la formele obişnuite, ceea ce, la fel, arată că ele reprezintă forme normale de creştere şi că dimensiunile lor nu sînt rezultatul unui simplu proces de dilatare, consecutiv unei absorbţii mari de apă, ci unei creşteri reale de volum.

FORME BACTERIENE FILTRABILE

Existenţa formelor filtrabile a preocupat pe biologi şi morfologi, această existenţă apărînd, uneori, ca un proces de variaţie legat de forma şi dimensiunile celulei. Formele bacteriene care se văd, în mod obişnuit, la microscopul cu lumină nu trec prin porii filtrelor. Unii cercetători, şi printre primii trebuie citat Fontès (1910), admit însă că în culturile bacteriene se găsesc formaţii de dimensiuni mult mai mici decît cele care se văd la microscop, şi care, în consecinţă, pot traversa filtrele. Se admite, mai departe, că formele filtrabile nu se cultivă pe medii obişnuite, dar că ele se pot cultiva pe medii propice şi aici pot reveni, după ce au trecut prin diverse stadii de dezvoltare, la aspectul şi dimensiunile iniţiale.

Înainte de a analiza, mai în amănunt, această problemă, trebuie să spunem că cercetările de acest fel sînt foarte anevoioase şi cer o tehnică şi o aparatură impecabile. Aparatura şi în primul rînd filtrul pot falsifica rezultatul. Astfel, un filtru care prezintă un singur por mai mare decît toţi ceilalţi poate da un filtrat infectat cu germeni de dimensiuni obişnuite. O tehnică defectuoasă poate duce, la fel, la rezultate false. Este cunoscut faptul că un cercetător, care se ocupa cu problema existenţei formelor filtrabile la bacilul tuberculozei, îşi infecta singur filtratele cu bacili pe care el, fiind tuberculos, îi elimina prin spută. Erori similare s-au făcut, tot în cazul bacilului tuberculozei, de alţi cercetători care căutau formele filtrabile ale bacilului tuberculozei în leziunile de tuberculoză bovină. În acest scop, ei inoculau filtratele obţinute din aceste leziuni la cobai. Animalele erau sacrificate după diverse intervale de timp şi din organele lor se făceau însămînţări pe diverse medii de cultură. În mediile acestea se dezvolta uneori un bacil acidorezistent, nepatogen, pe care autorii îl considerau o formă de trecere între bacilul virulent şi forma filtrabilă (Saenz). Ipoteza lor era însă total falsă, deoarece s-a constatat că bacilii acidorezistenţi nepatogeni se pot izola şi de la cobai normali, neinoculaţi cu nici un filtrat.

O tehnică defectuoasă duce, în mod sigur, la infectarea filtratelor cu germeni din aer, ceea ce la fel este un prilej de falsificare a rezultatelor. Aceste diverse motive fac ca rezultatele pozitive comunicate de unii cercetători să fie privite cu foarte multă rezervă.

Existenţa formelor bacteriene filtrabile nu poate fi totuşi total şi definitiv negată, dar trebuie spus că, în orice caz, prezenţa acestor forme în culturile bacteriene nu este un fenomen curent, în sensul că nu este întîlnit în mod obişnuit (Krasilnikov, 1954, Stern 1954, Kanunikova 1954, Melikova, 1954) etc.

Dovezi, în această privinţă, nu lipsesc. Astfel, filtrarea este aplicată de mult timp şi pe scară industrială în practica preparării toxinelor tetanice, difterice, în practica purificării serurilor imune infectate şi ea a permis, în mod regulat, obţinerea unor filtrate care îşi menţin lung timp sterilitatea, ceea ce nu s-ar obţine, desigur, dacă formele filtrabile ar apărea,

Scanned with OKEN Scanner

în mod curent, într-o cultură. Stern (1954), ocupîndu-se de apariţia formelor filtrabile la streptococii hemolitici, găseşte că o formă filtrabilă corespunde la 15—20 milioane de forme normale.

Fenomenul apariţiei formelor filtrabile, chiar dacă este real, aşa cum afirmă un număr important de cercetători printre care şi cunoscuţii cercetători sovietici Suknev, Kalina şi alţii, el are un caracter sporadic şi este legat de anumite condiţii de mediu, de prezenţa, în aceste medii, a unor factori care acţionează energic asupra celulei bacteriene, impunîndu-i o transformare a formei sale. Factorii capabili să opereze o asemenea transformare sînt, după cercetările de pînă acum, următorii:

1. factorii biologici — bacteriofagul, antagonismul bacterian, produşii proprii de dezasimilaţie etc.;
2. factori fizici — congelarea şi decongelarea, repetate;
3. factorii chimici.

Factorii biologici şi, în primul rînd, bacteriofagul au fost încriminaţi ca agenţi producători de forme filtrabile. Citäm, în acest sens, pe Vlastelița (1940) care obţine asemenea forme din culturile de stafilococi trataţi cu bacteriofag. Rezultate asemănătoare s-au obţinut, tot sub influenţa bacteriofagului, la alte specii; d'Herelle, de exemplu, obţine, sub influenţa bacteriofagului, forme filtrante din culturile de bacili ai dizenteriei, iar alţi cercetători din *Salmonella typhosa, Escherichia coli, Bacillus proteus* etc. In culturi mixte, în care speciile asociate exercită un antagonism reciproc, s-au semnalat la fel apariţia formelor filtrante.

N. Stamatin, de exemplu, a constatat că asociind într-o cultură cu bulion o bacterie Gram negativă cu un stafilococ patogen se produce o puternică inhibiţie în dezvoltarea stafilococului. Filtratul unei asemenea culturi mixte, conservat cîteva zile la 37°C, devine uşor opalescent şi prin examenul microscopic s-a constatat prezenţa unor granule de forme cocoide şi Gram pozitive. Se pare că, în acest caz, sub influenţa antagonistă dintre cei doi germeni, au luat naştere forme filtrabile. Principii litici, de altă natură decît bacteriofagul, puteau fi puşi de altfel în evidenţă prin cultivarea celor doi germeni în amestec pe agar. Se observă, în acest caz, că în jurul coloniilor de stafilococi se produce o zonă netă de liză a germenilor Gram negativi.

Produşii proprii de dezasimilaţie pot constitui factori care favorizează apariţia formelor filtrante. Kudneakov şi Reznikova (1952) constată, de exemplu, că din 11 filtrate, iniţial sterile, obţinute din culturi pure de *Salmonella enteritidis* Gärtner vechi de 10—35 de zile, două, după mai multe treceri pe anumite medii, au dat formele normale ale acestei specii bacteriene.

Factorii fizici — îngheţul şi dezgheţul — sau **factorii chimici** pot duce la fel, la apariţia formelor filtrabile. Manusakean, de exemplu, obţine forme filtrabile de stafilococi cultivînd aceşti germeni într-o atmosferă de bioxid de carbon.

Formele filtrabile, care apar sub influenţa diverşilor factori de mediu, nu dau naştere, în culturile imediat următoare, la germeni în totul asemănători celor din care ei provin. Apar, adeseori, aşa cum semnalează numeroşi cercetători, forme intermediare, granulare şi vizibile, care conferă un uşor grad de opalescenţă mediului de cultură. Este necesar ca această formă să fie îndeaproape şi îndelung urmărită pentru a ajunge la forma iniţială. Muromţev (1951) afirmă, în această privinţă, că regenera-

rea formei inițiale din forma filtrabilă necesită de la cîteva zile la cîteva luni. Tot el face observația că numai un număr redus de forme filtrabile regenerează celula, adăugînd că formele filtrabile au pentru celula bacteriană același rol ca și sporii : conservă viața, dar nu o multiplică. După Stern (1954) formele filtrabile se pot totuși multiplica, însă viteza de multiplicare este redusă, 2—3 diviziuni în 24 de ore.

Kalina a arătat că întoarcerea formelor filtrabile la formele inițiale poate fi înlesnită prin intervenția anumitor condiții de mediu cum sînt :

1. cultivarea îndelungată pe diferite medii și la diverse temperaturi ;
2. inoculări succesive la animale receptive ;
3. cultivarea în prezența unor germeni, cum sînt sarcinele sau stafilococii, care înlesnesc, așa cum a arătat Suknev, regenerarea bacteriilor din formele lor filtrabile ; acest procedeu este cunoscut sub numele de metoda doicilor.

Apariția formelor filtrabile la bacterii, în condițiile examinate mai sus, este un fenomen interesant din punct de vedere al biologiei generale. Ea demonstrează, în primul rînd, plasticitatea bacteriilor, iar, în al doilea rînd, constituie o confirmare a teoriilor emise de O. B. Lepeșinskaia. Intr-adevăr, formele filtrabile pot fi, după Krasilnikov, de două feluri : unele sînt celulele foarte mici, dar care nu diferă de celula-mamă decît dimensional, altele nu reprezintă însă decît fracțiuni ale celulei, părți din substanța constituentă a celulei, dar nu celula în totalitatea ei. Existența acestor din urmă forme și capacitatea lor de a regenera celula arată, încă o dată, că această din urmă celulă se poate naște și din materia vie, din fracțiuni de substanță celulară și nu, în mod obligatoriu, dintr-o altă celulă completă. Aceste date infirmă teoria celulară a lui Virchow, teorie după care o celulă nu poate proveni decît dintr-o altă celulă.

Lepeșinskaia afirmă, în această privință, că celulele se pot regenera din substanța vie care provine din celule dezintegrate sub influența unor factori mecanici. Celula, în urma acestei influențe, încetează de a exista ca atare, dar componenții ei, în condiții favorabile, se păstrează ca substanță vie, care dezvoltîndu-se se poate transforma în celule.

In acest sens trebuie interpretat fenomenul apariției formelor filtrabile la bacterii. El este un accident și nu o regulă, așa cum o socotesc unii cercetători cum sînt Löhnis (1921), Enderlein (1925) etc. Aceștia afirmă că viața la bacterii are o evoluție ciclică și în cursul acestei evoluții celulele trec, în mod obligatoriu, prin mai multe aspecte morfologice, aspecte legate de anumite funcțiuni fiziologice. In acest ciclu bacteriile ar prezenta și un stadiu filtrabil — în general nepatogen — forma celulară reprezentînd stadiul nefiltrabil și eventual patogen. Unii cercetători au legat existența formelor filtrabile de un anumit mod de multiplicare a bacteriilor. Ei admit că bacteriile s-ar multiplica nu numai prin sciziparitate, ci și prin gonidii ca ciupercile. Gonidiile, forme granulare, dimensional situate la limita vizibilității cu microscopul cu lumină, s-ar forma în celule speciale, avînd dimensiuni mai importante și avînd rolul unor sporangii sau gonidangii. La *Bacillus anthracis* se observă, uneori, celule fusiforme mari, care conțin un număr important de granule sau gonidii. Aceste gonidii ar fi filtrabile și capabile să regenereze celula. Dacă multiplicarea prin gonidii ar fi normală la bacterii, ar trebui ca aceste gonidii să fie prezente, în

Scanned with OKEN Scanner

mod curent, în culturi şi deci, în mod constant, să se găsească forme filtrabile în culturile bacteriene. Dar acest lucru nu se întîmplă cu regularitate, ceea ce pune la îndoială justeţea ipotezei.

FORMELE L

Problema formelor filtrabile a intrat într-o nouă fază, prin descoperirea aşa-numitelor forme L care au fost descrise, pentru prima oară, de Klieneberger (1935) de la Institutul Lister din Londra şi care le-a numit L după numele institutului în care lucra. Autoarea a observat aceste forme la specia bacteriană *Streptobacillus moniliformis,* specie descrisă de Levaditi, Nicolau şi Pointcloux în 1925, şi izolată de la om şi din secreţiile nazofaringiene de la şobolani. De la şobolan germenul se transmite, prin muşcătură, la om. Pentru izolarea germenului, secreţiile nazofaringiene de şobolan se injectează la şoareci şi apoi se fac culturi din sîngele şoarecilor.

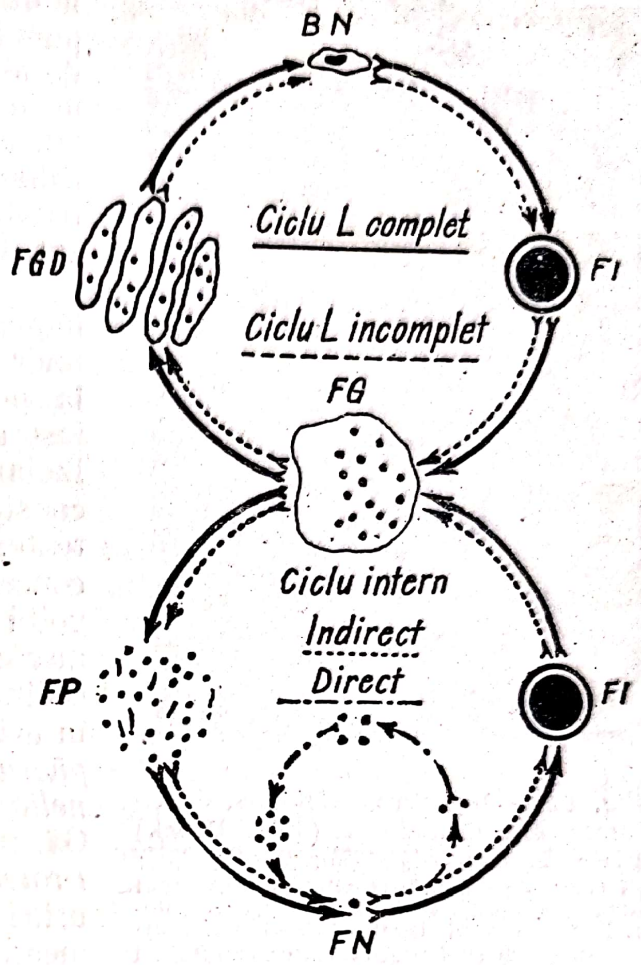


Fig. 20 — Schema lui Tulause arătînd modul de reproducere a formelor L şi diferenţierea ciclului L complet de ciclul L incomplet
BN — bacterie normală; *FI* — formă intermediară; *FG* — formă gigantică; *FP* — formă pitică; *FGD* — formă gigantică în diviziune

Studiindu-se morfologia acestui germen, autoarea a putut observa existenţa a două categorii de elemente morfologic distincte şi anume: forme bacilare şi forme granulare, tipice; acestea din urmă au fost numite L şi ele se găsesc pe suprafaţă, la exteriorul celor dintîi. Întinzînd, pe suprafaţa agarului cu ser, o asemenea cultură, se obţineau, după o incubaţie de 8 zile, două feluri de colonii, din care unele conţineau numai streptobacili şi celelalte numai forme L. Coloniile L prezentau un ombilic central de culoare închisă, înfundat în agar, înconjurat de o zonă, un halo, de culoare deschisă şi neînfundat în agar, plutind parcă la suprafaţa mediului. Iniţial, s-a crezut că între cele două forme nu există nici o legătură, ele fiind două specii distincte care se dezvoltau în simbioză. Cercetările care au urmat au dovedit însă că formele L sînt o variantă şi derivă din *Streptobacillus moniliformis,* că ele sînt un alt mod de prezentare al aceleiaşi specii. Această afirmaţie se sprijină pe argumente de ordin morfologic, biochimic şi serologic. Morfologic, s-a putut demonstra că formele L iau naştere din formele sferoide mari, care apar în culturile de *Str. moniliformis,* ca o consecinţă a evoluţiei formelor bacilare. Formele sferice, constituite în culturi, transplantate pe alte medii, încep să producă, unele din ele, dar nu toate, forme granulare pitice, care se situează la suprafaţa sferelor; de aici, ele se înfundă în mediu şi încep să se

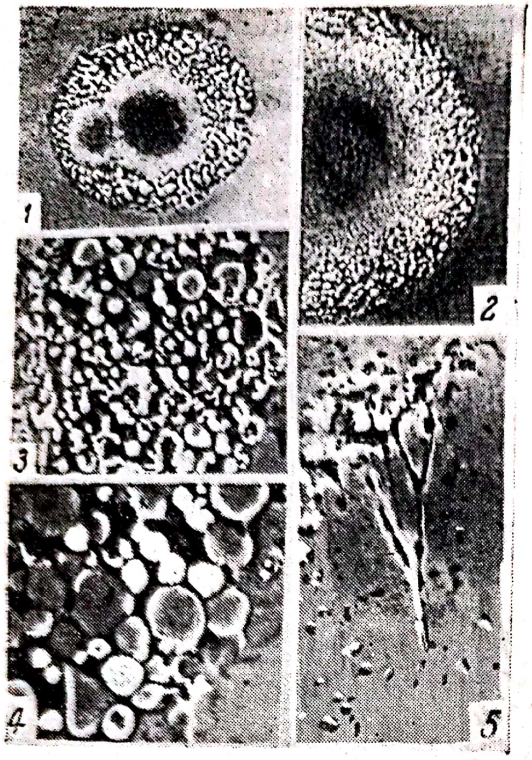


Fig. 21 — Aspecte morfologice şi culturale ale formelor L (după **Minck**) 1 şi 2 — colonii *L* ale unui bacil sporulat (X 110); 3 — marginile coloniei L ale unui bacil sporulat (X 480); 4 — marginile coloniei L ale unui bacil sporulat (X 990); 5—forme L de *Proteus*; filamente cu umflături

multiplice dînd colonii de tip L. Din punct de vedere biochimic s-a constatat, de asemenea, că formele bacilare şi formele L se comportă calitativ la fel; astfel, ambele forme fermentează aceleaşi zaharuri, însă formele L mai puţin intens ca cele bacilare. Serologic, s-a văzut, la fel, că ele sînt antigenic identice.

Problema prezentînd o deosebită importanţă, cercetările în scopul obţinerii unor forme L, similare cu cele ce apar la specia *Streptobacillus moniliformis,* au fost extinse şi la alte specii bacteriene. Izolarea acestor forme a fost uşurată de constatarea că ele sînt penicilinorezistente. Într-adevăr, în medii care conţin concentraţii mari de penicilină se dezvoltă numai formele L, formele homeomorfe fiind inhibate de antibiotic. Procedîndu-se în acest fel, s-au putut pune în evidenţă forme L la *Bacterium necrophorum, Haemophilus influenzae, Salmonella typhi murium, Salm. enteritidis* Gärtner, şi mai ales la speciile din genul *Proteus*. Tulpinile de *Proteus,* izolate din urină sau materii fecale, însămînţate în medii cu ser care conţin 50 U. I. de penicilină pe 1 ml şi incubate în aerobioză dau naştere la forme sferice, din care prin treceri pe medii solide pot lua naştere forme L. Acestea, pe agar (0,5—1% fibre), cu 10—20% ser de cal, dau naştere, în 2—3 zile, la colonii L asemănătoare celor descrise deja la specia *Streptobacillus moniliformis*. Culturile de *Salmonella typhi murium,* însămînţate pe agar moale cu ser de cal şi penicilină, incubate în anaerobioză, dau naştere, de asemenea, la forme L care se conservă însă numai în anaerobioză. Cunoscîndu-se o tehnică de izolare a formelor L, s-a putut trece la cercetarea proprietăţilor acestor forme. Prin folosirea unor metode speciale de fixare şi colorare, s-au putut obţine unele date cu privire la morfologia lor. Formele L sînt rotunde, prezentîndu-se ca nişte granule şi măsurînd, în medie, 175—250 mm; au o membrană mai fină ca a bacteriilor. Conţin o cantitate mare de cromatină, care este înconjurată de o zonă fină de citoplasmă. Din punct de vedere chimic, după B o i v i n, formele L conţin mai mult acid dezoxiribonucleic şi mai puţin acid ribonucleic.

Formele L se dezvoltă numai pe medii care conţin proteină nativă şi, din acest punct de vedere, se deosebesc de formele bacilare. Ceea ce deosebeşte net formele L de formele bacilare, este marea lor rezistenţă la penicilină. Astfel, în timp ce formele bacilare, homeomorfe, ale speciei *Streptobacillus moniliformis,* sînt inhibate de o concentraţie de 0,2 U. I. penicilină pe 1 ml, formele L cresc chiar într-o concentraţie de 10 000 U. I. penicilină pe 1 ml. O inhibare parţială a dezvoltării se obţine la o concentraţie de 100 000 U. I. pe 1 ml, ceea ce revine la 60,6 mg de penicilină pe 1 ml. Faţă

de celelalte antibiotice, formele L sînt relativ sensibile; astfel, ele sînt inhibate de teramicină, cloromicetină, aureomicină sau streptomicină. Sînt sensibile față de glicerină și carboximetoxilamină.

Cercetările serologice au arătat că între formele homeomorfe și formele L există strînse relații de structură antigenică. Astfel, preparîndu-se trei seruri cu forme homeomorfe de *Proteus* și trei seruri cu formele L ale aceleiași specii, s-a putut constata că serurile L aglutinează formele homeomorfe și invers.

Recurgîndu-se la metoda adsorbției aglutininelor, s-a observat însă că în timp ce formele homeomorfe fixează toate aglutininele din serurile L, formele L nu le fixează în totalitate pe cele din serurile preparate cu formele bacilare de *Proteus*. Rezultă de aici că în formele L există numai o parte din antigenii formelor bacilare, că prin trecerea din forma bacilară în forma L se pierd o parte din compușii chimici ai celulei.

Forma L este deci o celulă simplificată, cu o structură chimică redusă.

Relațiile dintre formele L și formele bacteriene homeomorfe rezultă și din observațiile făcute de numeroșii cercetători (Moustardier și col., 1953), după care formele L pot regenera forma bacteriană. Astfel, inoculîndu-se la șoareci culturi de forme L se poate uneori produce o infecție mortală, de la animal izolîndu-se o tulpină obișnuită de *Proteus*. Uneori însă șoarecii, astfel inoculați, nu mor, dar trituratul ficatului lor, recoltat după sacrificare, poate produce o infecție cu *Proteus* la șoareci. Formele L de *Proteus* pot reveni la forme bacilare chiar prin cultivarea pe medii de cultură. S-a observat, în această privință, că unele tipuri de colonii L dau mai curînd formele bacilare decît altele. Astfel așa-numitele colonii L 3 A dau, în prima trecere de pe agar cu penicilină, pe agar fără penicilină, forme bacilare normale. Formele L, menținute mult timp pe medii cu penicilină, revin mai greu la forma bacilară. Se pare deci că, în aceste condiții, se produce o stabilizare a formei L.

Intre formele L și agenții peripneumoniei bovideelor și ai agalaxiei contagioase a oilor și caprelor există multe asemănări. Astfel și unii și alții se cultivă pe medii cu ser, au o morfologie asemănătoare, sînt rezistenți la penicilină etc. Unii cercetători au mers atît de departe încît au afirmat că agenții peripneumoniei și agalaxiei sînt formele L stabilizate ale unor specii bacteriene. Această afirmație nu pare a corespunde realității și Oerskov observă, în acest sens, că agenții peripneumoniei și agalaxiei au o morfologie mult mai complexă, că ei prezintă în evoluția lor un stadiu micelial care este absent la formele L obținute, în condiții de laborator, din culturile homeomorfe ale diverselor specii bacteriene. Formele sferoide, care se întîlnesc în culturile speciei *Borrelomyces peripneumoniae* sînt, după Oerskov, produse de degenerare și nu constituie locul unde iau naștere formele granulare.

Din datele sumare pe care le-am expus mai sus reiese că în anumite condiții de mediu, condiții în general dizgenetice, din formele bacteriene homeomorfe iau naștere forme noi, de adaptare, care reprezintă, din punct de vedere chimic, o parte din celula originală, dar care poate să perpetueze specia în condițiile noi create. Aceste forme, astfel create, se deosebesc de celulele bacteriene normale, în special prin dimensiunile lor, și uneori (în cazul formelor L) și prin incapacitatea de a se cultiva în afara prezenței unei proteine native. Ceea ce de asemenea le distinge de formele normale este marea lor rezistență la penicilină. Această însușire este totdeauna prezentă

Scanned with OKEN Scanner

la formele L şi ea se găseşte chiar la formele L care au fost obţinute prin alte metode decît prin cultivarea în medii cu penicilină. Este deci o proprietate legată de această formă. Existenţa formelor pitice sau L demonstrează încă o dată plasticitatea pe care o au bacteriile, în special, şi materia vie, în general.

VARIAŢII PRIVIND ALTE CARACTERE MORFOLOGICE DECÎT FORMA

În afara modificărilor de formă, bacteriile pot prezenta, de multe ori, alte variaţii privind caracterele morfologice. Astfel, speciile bacteriene, mobile şi ciliate pot pierde definitiv cilii şi devin imobile. Weil şi Felix (1917) au obţinut o asemenea variantă la specia *Proteus vulgaris*. O dată cu cilii, germenul mai pierde şi alte caractere. Astfel, tipul normal, mobil, dă pe mediile solide o cultură care se întinde ca o membrană fină, ca vaporii de apă suflaţi pe o sticlă (Hauch, în limba germană, de unde denumirea de H, dată, în general, tuturor variantelor ciliate ale speciilor mobile) ; varianta imobilă, datorită tocmai imobilităţii ei, dimpotrivă, dă colonii izolate; această variantă este numită „ohne Hauch", adică fără capacitatea de a roi şi a se răspîndi pe toată suprafaţa mediului. Variantele imobile ale speciilor mobile au fost numite, după acest termen, O. Alţi cercetători înainte şi după Weil şi Felix au observat mutilări asemănătoare şi la alte specii mobile, mai ales la cele din grupul bacteriilor intestinale. Bălteanu (1921) a găsit cele două variante, H şi O, la vibrionul holerei.

Variantele mobile, cum este de aşteptat, se deosebesc antigenic de cele imobile. Acestea din urmă sînt, într-adevăr, lipsite de antigenul flagelar sau ciliar. Antigenul flagelar este cunoscut şi sub numele de antigen H, deoarece el este apanajul variantelor H, mobile. Variantele H au comun cu variantele O antigenul somatic, care este singurul reprezentant antigenic al variantelor O şi a fost numit antigen O. Varianta mobilă va avea deci două grupe antigenice şi anume : antigeni H legaţi de cili şi antigeni O, prezenţi în corpul bacterian, în timp ce varianta imobilă posedă numai pe ultimii. La aceeaşi specie, antigenul O al celor două variante (mobilă şi imobilă) este identic.

Trecerea unei bacterii de la forma mobilă la cea imobilă nu trebuie să fie identificată cu disocierea bacteriană, cu desfacerea tipului R din S. Într-adevăr, tipul R se deosebeşte de S prin structura sa somatică şi nu prin prezenţa sau absenţa cililor. Cele două variante S şi R pot prezenta fiecare, ca subvariante, formele H şi O, adică mobile şi imobile.

Prezenţa sau absenţa capsulei condiţionează caracterele culturale, morfologice, patogenice şi serologice ale unei tulpini. S-a constatat, în acest sens, că pneumococii capsulaţi aparţin cultural formei S virulente, în timp ce cei necapsulaţi au caracterele culturale ale formei R şi sînt lipsiţi de patogenitate. Constatări similare s-au făcut şi cu privire la pneumobacilul lui Friedländer (*Klebsiella pneumoniae*). Variantele de *Bacillus anthracis*, care au pierdut capacitatea capsulogenetică, sînt lipsite, în mod practic, de putere patogenă. Prezenţa sau absenţa capsulei la un germene poate fi în legătură cu sezonul. Valentina Roşca (1937) studiind o tulpină neidentificată şi denumită bacilul R constată, în acest sens, că germenul este capsulat vara şi ciliat iarna.

Scanned with OKEN Scanner

Sporogeneza este o caracteristică morfologică și biologică supusă variației. Încă din anul 1904 Preisz observă că butonii (coloniile fiice) dezvoltați deasupra coloniilor primare și sporogene de *Bacillus anthracis* pot conține germeni asporogeni. Plecînd de la acești butoni de formație secundară, se pot izola, de la unele tulpini, variante constant asporogene. Variante asporogene de *B. anthracis* pot lua naștere și în bulion, printr-un mecanism probabil similar cu cel care duce, pe agar, la formarea de colonii fiice. N. Stamatin observă că în bulion unele culturi izolate direct din organele animalelor cărbunoase, după cîteva zile la temperatura camerei, își pot modifica aspectul și anume bulionul nu mai este perfect limpede, ci reprezintă o ușoară tulburare; făcînd transplantări dintr-un asemenea bulion el a putut izola, din unele tulpini, variante asporogene.

VARIAȚII PRIVIND ASPECTUL CULTURAL

Variațiile din acest punct de vedere sînt frecvente la bacterii. Astfel, coloniile pe agar ale bacilului cărbunelui pot îmbrăca aspectele cele mai variate. În momentul izolării din organele animalelor spontan îmbolnăvite, coloniile tulpinilor de cărbune se prezintă, în mod obișnuit, sub același aspect. Prin conservarea pe mediile artificiale, acest aspect suferă numeroase schimbări. Nu se constată totdeauna relații între aspectul cultural și alte caractere, în special de patogenitate. Colonii aspre, cu prelungiri laterale și prezentînd aspectul cultural al germenilor virulenți, pot conține germeni total avirulenți și invers, colonii rotunde, atipice, pot fi constituite de germeni de o virulență plină. Asemenea neconcordanță se observă și la alte specii. Variațiile culturale prezintă o importanță deosebită atunci cînd sînt în legătură și trădează alte modificări privind biologia bacteriei respective, astfel cum este cazul variantelor S și R, H și O etc.

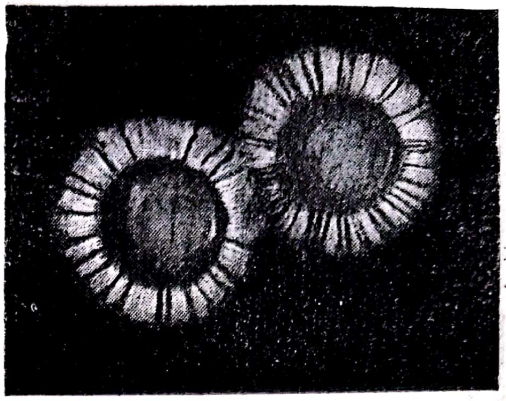


Fig. 22 — Colonii în formă de rozetă de *Pasteurella animalium* (după **Dräger** și **Schindler**)

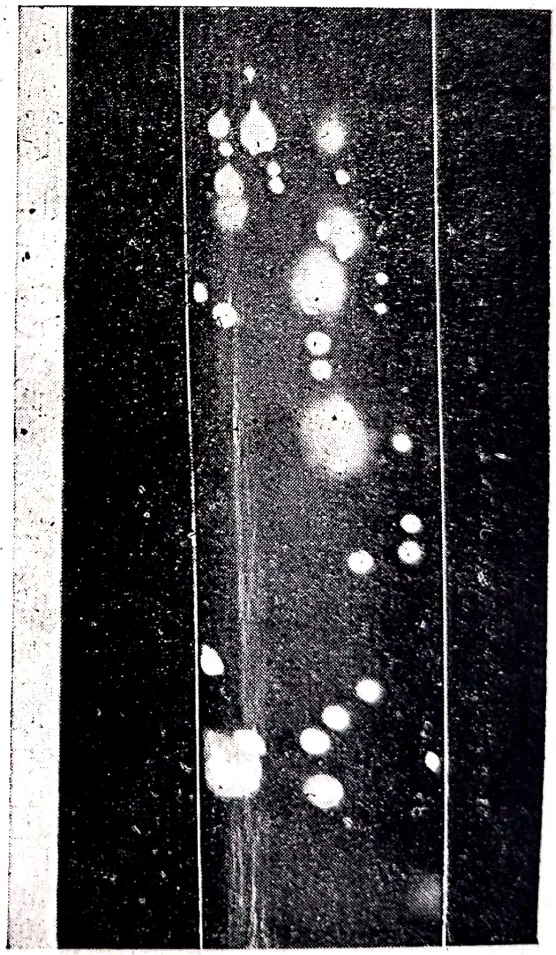


Fig. 23 — Tulpină asporogenă de *Bacillus anthracis*

Disociere pe agar în două tipuri de colonii: unele mici, opace și albe, altele mai mari, albăstrui, transparente

Scanned with OKEN Scanner

VARIAȚII PRIVIND PATOGENITATEA

Patogenitatea este caracterul a cărui variabilitate a fost demonstrată încă din primele timpuri ale bacteriologiei. Astfel, P a s t e u r, lăsînd o cultură de *Pasteurella* la termostat o găsește, după 1 lună de zile, lipsită de patogenitate. Tot el constată că tulpinile virulente de *Bacillus anthracis* se atenuează dacă sînt cultivate, sub forma lor vegetativă, la temperatura de 42—43° C. O. B a i l obține o degradare a virulenței unei tulpini de cărbune prin încălzirea unei culturi vechi de 16 ore, timp de 4 ore la 48° C. În general, toate tulpinile patogene, prin cultivarea pe medii artificiale, pierd, cel puțin în parte, proprietățile care asigurau dezvoltarea procesului morbid. Această degradare a virulenței se face mai repede la speciile asporogene ca la cele sporulate, sporul conservînd timp mai îndelungat proprietățile de patogenitate ale speciei. Prin treceri regulate, la intervale anumite, pe medii proaspete și cît mai favorabile germenului considerat, patogenitatea speciilor asporogene poate fi conservată un timp apreciabil, dar variabil de la o specie la alta. Alterarea patogenității, în special a tulpinilor asporogene, se face cu ușurință prin învechirea culturii pe același mediu sau prin cultivarea în medii defavorabile. În medii cu antiseptice, R o u x și C h a m b e r l a n d obțin, de exemplu, atenuarea bacilului cărbunelui. Bila, factor dizgenetic pentru unii germeni, înlesnește apariția variantelor atenuate sau lipsite total de patogenitate. Astfel, pneumococul, în asemenea medii, își pierde complet virulența. La fel, bacilul tuberculozei, pe cartof biliat, după un număr important de pasagii s-a transformat într-un bacil atenuat, numit B.C.G., care a putut fi folosit la vaccinarea omului și animalelor. Lichidele de origine animală pot produce, la fel, atenuarea unor tulpini. Astfel, *Bacillus anthracis* virulent, cultivat în sînge defibrinat de cal, dă naștere la variante cu o virulență redusă. Serul imun poate juca rolul unui factor disgenetic pentru unele specii bacteriene. Pneumococul virulent, de exemplu, cultivat în medii cu ser antipneumococic, devine avirulent. Alterarea virulenței în aceste condiții nu atinge, în general, întreaga populație a unei culturi.

Conservarea patogenității constituie, mai ales pentru unele specii, o problemă greu de rezolvat. Pe mediile de cultură în general, virulența ca și toxicitatea bacteriilor se degradează. În aceste condiții, celule microbiene, din ce în ce mai puțin virulente și, în mod obișnuit, mai apte să se dezvolte pe medii artificiale de cultură, iau locul celulelor virulente, care tocmai datorită parazitizmului lor exagerat, adaptării la condițiile de multiplicare in vivo, au pierdut plasticitatea necesară cultivării lor în vitro.

In aceste condiții, la fiecare transplantare a tulpinii se trec, pe mediul proaspăt, din ce în ce mai mulți germeni atenuați și din ce în ce mai puțin virulenți. Aceștia din urmă, mai ales în mediile lichide, sînt substituiți de cei dintîi, care se multiplică mai repede ca cei adaptați vieții parazitare. Această cursă a degradării virulenței poate fi întreruptă printr-o trecere prin organismul unui animal sensibil; organismul în acest caz are rolul unui selector; el elimină germenii avirulenți sau atenuați și alege pe cei mai virulenți. Se obțin efecte contrarii, adică atenuarea virulenței atunci cînd animalul ales pentru trecere are un grad oarecare de rezistență față de bacteria a cărei virulență vrem s-o exaltăm. Astfel, bacilul rujetului se atenuează, pentru porc, prin treceri pe iepure, iar bacilul tubercu-

Scanned with OKEN Scanner

lozei umane prin cultivarea, în saci de colodiu, în peritoneul de găină. Nu numai specia animală joacă un rol important în procesul de conservare sau de degradare a virulenţei, ci şi ţesuturile în care se inoculează microbul. Virusul variolei ovine pierde tropismul său pentru derm, prin treceri repetate pe ţesutul hipodermic ; la fel, virusul vaccinal îşi schimbă proprietăţile prin treceri pe ţesutul cerebral de iepure.

Cînd trecerile pe animale nu sînt posibile sau nu dau rezultatele dorite, se recurge, în vederea conservării virulenţei, la medii care oferă cele mai bune condiţii de creştere a germenului considerat. Mediile cu ou, de exemplu, care permit o multiplicare rapidă a bacilului tuberculozei, conservă, mai bine decît cartoful glicerinat, atît caracterele culturale, cît şi patogenitatea acestui bacil, în special a celui de tip aviar. Pneumococii îşi conservă mai bine virulenţa în mediul T ca în cele obişnuite.

În conservarea virulenţei unei tulpini, selecţia are un rol important. Celulele unei populaţii bacteriene nu sînt totdeauna egale, ci pot diferi între ele prin proprietăţi morfologice, culturale şi de patogenitate. Transplantînd mase de asemenea germeni, fără o selecţie a lor, se ajunge repede la o variantă care nu mai are decît puţine din însuşirile iniţiale ale tulpinii. Este necesar, atunci cînd se face trecerea dintr-o cultură veche pe un mediu proaspăt, să se aleagă, din populaţia bacteriană a culturii vechi, germenii care convin cel mai mult scopului urmărit. În acest scop, se fac dispersiuni pe medii solide, astfel ca să se obţină colonii izolate care pot fi individual examinate şi cercetate. În aceste condiţii, se pot alege colonii care conţin germenii doriţi. În consecinţă, fiecare pasaj al unei culturi dintr-o colecţie bacteriană trebuie să fie o operaţie de selecţie, de alegere a germenilor care reprezintă, în cel mai înalt grad, germenul iniţial introdus în colecţie. Procesul de degradare a virulenţei se încadrează în legile care guvernează raporturile dintre materia vie şi mediul înconjurător şi confirmă teoriile miciuriniste. Funcţiunile de patogenitate se conservă şi se exaltă în organismul animalului sensibil şi se pierd în afara acestui organism în folosul altor funcţiuni care servesc mai bine specia. Mediul imprimă sensul evoluţiei unei bacterii.

VARIAŢII PRIVIND ECHIPAMENTUL ENZIMATIC

Asemenea variaţii se întîlnesc frecvent la bacterii. Varianta *Bacterium coli mutabile,* de exemplu, este incapabilă să atace lactoza, dar poate da naştere la variante care o fermentează. Tendinţa aceasta de a reveni la însuşirile normale ale speciei este foarte accentuată şi se manifestă prin formarea coloniilor fiice. Revenirea, în acest caz, la normalul speciei, nu se poate face decît pe această cale.

Variante care pierd sau cîştigă unele proprietăţi fermentative, în raport cu tulpina tip a speciei, au fost descrise la multe specii bacteriene. S-a constatat, de exemplu, că o tulpină de bacil al dizenteriei produce, pe agar turnesolat şi cu maltoză, colonii albastre, ceea ce înseamnă că germenul nu fermentează acest zahar ; deasupra coloniilor primare ale acestei variante se dezvoltă însă, cu timpul, colonii fiice care înroşesc mediul şi care deci conţin germeni activi faţă de maltoză. Observaţii similare s-au făcut şi asupra altor specii. Astfel, tulpinile de *Salmonella pullorum* se deosebesc, în mod practic, de cele de *Salm. gallinarum* prin aceea că nu fermentează

maltoza, dar I. Popovici şi V. Bica Popii (1950) au arătat că tulpinile de *Salm. pullorum* pot deveni active, faţă de acest zahar, prin cultivarea lor în apă peptonată maltozată. Unele tulpini acidifiază acest mediu după cîteva zile, iar altele după cîteva săptămîni. La fel, Kudreavţev obţine, din tulpini de *Saccharomyces paradoxus,* inactive faţă de maltoză, germenii maltozopozitivi prin îndelungata lor cultivare în medii cu malzotă.

Unele tulpini de *Salmonella typhosa* produc indol şi folosesc amoniacul ca izvor de azot, deşi tulpinile tip sînt neindoligene şi incapabile de a folosi amoniacul.

Capacitatea proteolitică a unor tulpini, aparţinînd speciilor proteolitice, poate să dispară, apărînd, astfel, tulpini atipice în cadrul speciilor respective. S-a constatat, astfel, că varianta O a speciei *Proteus* X_{19} este mai puţin activă faţă de gelatină ca tulpina H din care s-a desfăcut. La fel, *Vibrio cholerae, Bacillus subtilis, B. pyocyaneus* pot pierde complet capacitatea lor gelatinolitică.

Escherichia coli, în urma iradierii cu raze X, pierde însuşirea de a sintetiza unii factori de creştere ca acidul nicotinic, tiamina, triptofanul etc. O asemenea variantă nu se multiplică decît în medii în care există aceşti metaboliţi esenţiali şi ea poate fi folosită pentru titrarea acizilor aminaţi respectivi. Mecanismul de acţiune al diverselor radiaţii asupra bacteriilor a fost interpretat just, în sens miciurinist, de cercetătorii sovietici (Moisel) care au dovedit, contrar afirmaţiilor geneticii formale, că aceste radiaţii distrug unele componente şi structuri chimice care duc la o modificare metabolică ereditară.

Producerea de pigment, la speciile obişnuit pigmentate, poate suferi modificări. Tulpinile de bacili piocianici, cele de stafilococ auriu sau citrin pot deveni nepigmentate. N. Stamatin a constatat, în acelaşi sens, că o tulpină de bacilul tuberculozei, de tip uman, care colora lichidul Sauton în brun, dădea naştere la o variantă care dezvoltîndu-se în acest lichid îl lasă necolorat. Se poate întîmpla însă şi invers: specii obişnuit incolore să dea naştere la variante pigmentate. Astfel, Roux şi Yersin au descris o variantă galbenă a bacilului difteriei, iar Băl teanu o variantă galbenă a vibrionului holerei.

VARIAŢII PRIVIND STRUCTURA ANTIGENICĂ

Acest fel de variaţii se întîlnesc de asemenea frecvent la bacterii. Diverşi cercetători au izolat, de exemplu, variante de *Salmonella typhosa* insensibile la acţiunea aglutinantă a serului respectiv, ceea ce înseamnă că germenii acestor variante nu conţin aglutinogenul prezent la majoritatea tulpinilor. Speciile mobile, după cum am mai spus, pot deveni imobile pierzînd o dată cu cilii şi sensibilitatea faţă de anticorpii flagelari.

Cele două aspecte culturale, S şi R, oglindesc şi o anumită structură antigenică. S-a constatat, de exemplu, că formele S ale speciilor din genul *Salmonella* posedă un antigen O, absent la formele R. Trecerea de la forma S la R se face deci cu pierdere de substanţă şi anume se pierde tocmai componentul bacterian care este, în parte, răspunzător de patogenitatea germenului.

Variantele R ale germenilor din grupul *Salmonella* conțin un antigen somatic diferit de al formelor S ; în plus, antigenul somatic al formelor R este lipsit de specificitate și, în consecință, un ser preparat cu o variantă R a oricărei specii din genul *Salmonella* va aglutina toate variantele R ale genului. Aceeași lipsă de specificitate se întîlnește și la serurile antipneumococice preparate cu variantele R ale speciei și, în consecință, un ser preparat cu varianta R necapsulată a tipului I va precipita antigenii somatici ai formelor R ale tuturor tipurilor de pneumococ (B o i v i n, 1938).

Structura antigenică, la unele specii, este supusă la fluctuații importante. Mediul de cultură influențează structura antigenică a bacteriilor C o m b i e s c u D. (1929). P i l l e t și colaboratorii (1951) constată, în acest sens, că aceeași tulpină de stafilococ dă cu același ser aglutinant rezultate diferite în raport cu mediul de cultură. Iată, în tabelul 18, titrurile aglutinante ale aceluiași ser față de trei tulpini cultivate pe trei medii diferite.

Tabelul 18

Titrul aglutinant al unui ser antistafilococic față de trei tulpini de stafilococ, cultivate pe medii diferite (după Pillet)

Tulpina	Titrul pentru mediul		
	A	B	C
6127	1/1000	1/750	1/50
6128	1/500	1/1000	1/100
6130	1/1000	1/1000	1/50

Rezultatele serologice privind variațiile structurii antigenice ale tulpinilor unei specii au fost confirmate de cercetările chimice. Într-adevăr, s-a putut izola din varianta S a fiecărui tip de pneumococ cîte o substanță polizaharidică, absentă în culturile variantei R a tipului respectiv. Astfel, substanța hidrocarbonată specifică și solubilă izolată de la tipul I nu dă reacțiile caracteristice substanțelor proteice, deci nu conține azot și rotește planul luminii polarizate cu +300, cea izolată de la tipul II nu conține azot, este slab acidă și rotește planul luminii polarizate cu +33. B o i v i n A. și M e s r o b e a n u L. (1933), coroborînd mijloacele de cercetare chimice cu cele serologice, au adus importante contribuții la studiul structurii antigenice a bacteriilor Gram negative. Acești autori reușesc să precizeze natura chimică a antigenului O prezent, în general, numai la formele S și răspunzător de diferențele de ordin serologic constatate între variantele S și R. Antigenul O este, după majoritatea autorilor, o substanță glucido-lipido-polipeptidică. Un asemenea antigen s-a izolat de la numeroase specii Gram negative și el lipsește la cele Gram pozitive de la care se izolează numai substanțe polizaharidice. Absența acestui antigen la formele R ale speciilor Gram negative și prezența la formele S ale aceleiași specii arată că diferența între cele două forme este, în special, de natură chimică. Forma S transformîndu-se în R pierde complexul glucido-lipidic, care ocupă, de altfel, în celulă o poziție periferică. Această transformare a tipului S în R, deci a pierderii antigenului glucido-lipidic de către formele S, nu se face dintr-o dată, ci treptat, astfel că între cele două tipuri pot exista forme intermediare care conțin antigenul O în cantități mai reduse.

Scanned with OKEN Scanner

O serie de variaţii, privind structura antigenică şi avînd un caracter particular, din cauza modului cum ele apar, au fost observate întîi la streptococi (fenomenul Cantacuzino) şi apoi la alte specii. Cantacuzino şi Bonciu (1926) au observat că streptococii nescarlatinoşi şi neaglutinabili printr-un ser antiscarlatinos devin aglutinabili atunci cînd sînt cultivaţi, în prealabil, în filtrate de produse scarlatinoase (exudat faringian sau urină provenind de la bolnavi de scarlatină) sau în medii cu asemenea produse. Însuşirea căpătată, în aceste condiţii, se transmite în serie în culturi, ceea ce înseamnă că nu este o simplă încărcare de suprafaţă a unei bacterii cu un antigen străin, ci este un fenomen de inducţie similar celui produs, în cazul pneumococilor, prin acidul dezoxiribonucleic, aşa cum se va arăta imediat. Modificări de tipul celor descrise la streptococi s-au întîlnit şi în cazul altor bacterii. Astfel, numeroşi cercetători au constatat că, de exemplu, tulpinile de colibacili izolate de la bolnavii de febră tifoidă sînt aglutinate de un ser antitific (vezi Popovici M., 1952). Convieţuirea celor doi germeni în acelaşi spaţiu (intestinul, în cazul de faţă) duce, în unele cazuri, la modificări reciproce.

CAUZA VARIAŢIILOR

Variaţiile bacteriene reprezintă, de cele mai multe ori, degradări ale unor caractere sau pierderea lor totală. Patogenitatea, de exemplu, este un caracter care se degradează, la unele specii, chiar prin simpla cultivare pe medii artificiale de cultură. În condiţii similare, speciile mobile pot pierde cilii, iar cele capsulate, capsula. Cîştigarea unor însuşiri pierdute este mult mai greu de realizat pentru o specie, dar acest lucru nu este imposibil. Faptul, observat de Griffith (1928), Alloway (1932), că un pneumococ avirulent poate reveni la forma virulentă şi capsulară atunci cînd este inoculat, la şoarece, împreună cu substanţa capsulară pneumococică sau cînd este cultivat în prezenţa pneumococilor de tip S, omorîţi, sau în filtratele acestora constituie un exemplu. Substanţa capsulară sau bacteriile moarte impun tipul lor pneumococului acapsulat şi deci virulenţa germenului astfel creat. Într-adevăr, dintr-un pneumococ R provenind din tipul II se obţine un pneumococ S de tipul III, dacă substanţa capsulară folosită provine de la acest din urmă tip. Avery şi colaboratorii (1944) au identificat natura chimică a substanţei care provoacă această transformare. Ei au arătat că acidul dezoxiribonucleic, izolat din pneumococul S de tip III, pus într-un mediu în care se cultivă un pneumococ R de tip II, provoacă trecerea acestuia din urmă într-un pneumococ S de tip III. Transformarea aceasta este profundă şi priveşte nu numai caracterele morfologice (apariţia capsulei), ci şi pe cele chimice. Într-adevăr, pneumococul S de tip II, din care provine forma R folosită în experienţă, secretă o capsulă constituită numai din zaharuri neutre, în timp ce pneumococul S de tip III, în care forma R II se transformă, secretă o capsulă formată din zaharuri neutre plus acizi uronici. Capacitatea de sinteză a germenului a fost deci modificată prin intervenţia acidului dezoxiribonucleic. S-a produs, în acest caz, o transformare dirijată într-un anumit sens prin intermediul acidului dezoxiribonucleic. Observaţii similare s-au făcut de către Boivin şi colaboratorii (1947) şi asupra variantelor R şi S de colibacili. Se pare deci că acidul de-

Scanned with OKEN Scanner

zoxiribonucleic al formelor S obligă celulele formelor R să sintetizeze compuși chimici care fac parte din celulele bacteriene de tip S. Colibacilii de tip R secretă, de exemplu, numai zaharuri neutre. În prezența acidului dezoxiribonucleic al formelor S, colibacilii de tip R secretă, pe lîngă zaharuri neutre și acizi uronici.

Muromțev (1949) ca și alți cercetători socotesc că acest fel de transformări trebuie încadrat în modificările produse prin hibridări vegetative, fenomen observat la plante de genialul cercetător al naturii Miciurin. Hibridarea vegetativă constă în imprimarea unor noi caractere unei plante pe cale somatică și nu sexuală. Astfel, semințele unui altoi capătă și transmit ereditar unele din caracterele portaltoiului, deși nu a avut loc nici un proces sexual între florile altoiului și cele ale portaltoiului. De exemplu, altoind pe o tulpină de tomate care dă pătlăgele roșii, o ramură de tomate care face pătlăgele galbene, se observă că pătlăgelele galbene care se dezvoltă pe altoi au semințe care cultivate pot da pătlăgele roșii. Pătlăgelele roșii de pe portaltoi sînt și ele influențate de altoi și unele din semințele obținute din fructele portaltoiului vor da pătlăgele galbene. Procese asemănătoare se petrec și atunci cînd două specii sau variante bacteriene se dezvoltă în același spațiu nutritiv. Transformarea plasmei germinative se face, și într-un caz și în altul, în afara procesului sexual, pe cale somatică.

Gamaleia și eleva sa Graceva obțin, de exemplu, transformarea unui colibacil într-un germen avînd toate caracterele speciei *Salmonella paratyphi* B. Modificarea colibacilului s-a obținut prin cultivarea sa într-un mediu care conținea germeni morți de *Salm. paratyphi* B. Modificări similare au fost obținute de mai mulți cercetători din U.R.S.S. printre care citäm pe Timakov. Acesta a urmărit fazele transformării unui colibacil într-o salmonelă, ajungînd la concluzia că transformarea este o consecință a modificării tipului normal de metabolism. Autorul, pentru a obține transformarea dorită, cultivă colibacilul în prezența bacililor tifici sau paratifici omorîți printr-o încălzire la 62°C, deci realizează condiții care au multe asemănări cu hibridarea vegetativă a lui Miciurin. Rezultate similare se obțin și atunci cînd o bacterie se cultivă într-un sac de colodiu introdus într-un mediu în care se cultivă altă bacterie. Factorii metabolici traversează peretele sacului de colodiu dintr-un sens în altul și produc modificări asupra bacteriilor respective. In același sens trebuie citată observația făcută de Tatum și colaboratorii (1946) după care variante de colibacili al căror metabolism a fost mutilat sub acțiunea razelor X și care, cultivate separat, își păstrează caracterele dobîndite, cîștigă însușirile originale ale speciei *Escherichia coli* cînd sînt cultivate împreună cu tulpini normale de colibacili. Este de presupus că mutilarea constă din pierderea unor fermenți și că germenii mutilați împrumută de la germenii normali fermenții absenți, precum și factorul care induce sinteza fermenților respectivi. Trebuie amintit aici și o observație făcută de prof. Ionescu C. Mihăiești și colaboratorii (1930) în domeniul virusurilor filtrabile. Autorii observă că amestecînd tulpini de virus poliomielitic de virulență redusă și inoculînd amestecul la maimuțe, se obține, de la acestea, o tulpină de o virulență crescută. Această creștere a virulenței nu se realizează cînd tulpinile se trec izolat pe maimuțe, ceea ce a făcut pe autori să admită că în cazul inoculării în amestec tulpina virulentă care rezultă și-a completat echipamentul său enzimatic de la tulpinile cu care a fost amestecată. Mai rezultă din

aceste date că atenuarea unei tulpini nu se datorește, în toate cazurile, pierderii aceluiași factor de virulență, ci într-un caz atenuarea se datorește pierderii unui factor, în alt caz, altui factor. Amestecînd și inoculînd la animale asemenea tulpini neuniform mutilate, factorii de virulență se pot asocia pe aceeași particulă de virus, luînd astfel naștere o tulpină care posedă toți factorii de virulență.

Transformări de felul celor citate mai sus se petrec și în condiții naturale, în special în tubul intestinal unde se realizează un contact intim și prelungit între mai multe specii microbiene.

Transformările tipurilor de pneumococi sînt de aceeași natură. Faptul că acidul dezoxiribonucleic, așa cum s-a arătat mai sus, transformă pneumococul R de tip II într-un pneumococ S de tip III dovedește că transformările obținute prin hibridările vegetative sînt provocate de anumite substanțe chimice. Teoretic deci, se poate admite că tulpinile de tomate cu fructe roșii, din exemplul dat mai sus, conțin o substanță care difuzează în altoi și portaltoi, ajunge la sămînța altoiului și îi transformă substratul ereditar, așa cum acidul dezoxiribonucleic transformă ereditar un tip bacterian în altul. Problema variațiilor s-ar putea simplifica dacă pentru fiecare caz s-ar putea izola substanța transformatoare respectivă.

Natura factorilor care pot, în condiții obișnuite de lucru, provoca apariția unor noi forme bacteriene este foarte variată ; factorii fizici, chimici, biologici, precum și paraziții bacteriilor (bacteriofagii) pot determina variația caracterelor.

Natura și compoziția mediului joacă un rol decisiv în producerea variațiilor, pentru că prin intermediul lor se schimbă metabolismul bacterian și schimbînd metabolismul se modifică însăși specia, așa cum a arătat Lîsenko. Astfel, pentru unii germeni reacția alcalină determină apariția variantelor, în timp ce cea acidă o împiedică. În acest sens, se observă că *Pasteurella animalium* se disociază într-un mediu cu pH egal cu 8,5 și își conservă caracterele la pH egal cu 6,0. La fel, se constată că bacteriile Gram negative se prezintă, în mediu acid, sub formă de coci sau bastonașe scurte, iar în mediul alcalin ca bastonașe lungi sau chiar filamente. Stafilococii sînt, în mediu acid, sferici, iar în mediu alcalin, ovoizi. Antisepticele adăugate mediilor, în concentrații care nu pot împiedica vegetația, provoacă degradarea unor caractere bacteriene și, în special, a patogenității. Fenolul, acidul sulfuric, bicromatul de potasiu au fost folosiți, de exemplu, de Chamberland și Roux (1883), Gamaleia (1888) pentru atenuarea tulpinilor virulente de bacilul cărbunelui. Cultivînd tulpini de *Proteus* X_{19} pe agar cu 0,17% fenol se obțin variantele O imobile. Speciile producătoare de pigment pierd această facultate cînd sînt cultivate pe medii care conțin antiseptice ca premanganat sau bicromat de potasiu. Materiile colorante ca violetul de metil, verdele de malachit, violetul gențiana etc. adăugate mediilor de cultură, chiar în concentrații infime, înlesnesc apariția variantelor bacteriene. Astfel, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* dau naștere la variante atunci cînd sînt cultivați pe un mediu care conține 1/200 000 violet de gențiana. Ionii de litiu, ca și cei de magneziu provoacă importante modificări ale formei celulelor bacteriene (Gamaleia, 1900). În mediile cu clorură de litiu 1%, unii autori observă, la bacteriile intestinale, o mărire a volumului celular. Celulele bacteriene îmbracă, o dată cu această mărire de volum, formele cele mai bizare. Concentrațiile mari de clorură de litiu

(3%) împiedică vegetaţia germenilor. Clorura de magneziu nu influenţează forma bacteriilor decît în concentraţii mari, 4,5%.

Polimorfismul bacterian este unanim recunoscut; bacteriile pot îmbrăca forme diferite fără a-şi micşora prin aceasta vitalitatea. Celulele mari, rotunde, care se întîlnesc în mediile cu săruri de litiu, se multiplică şi revin la aspectul obişnuit cînd sînt trecute pe medii de compoziţie normală. Aceste modificări celulare, care apar sub acţiunea unor substanţe cu acţiuni net antimicrobiene, sînt socotite ca reacţii adaptive. Ionii de litiu care sînt, aşa cum s-a arătat mai sus, bactericizi într-o concentraţie importantă, pătrund, atunci cînd concentraţia lor este tolerată, în interiorul bacteriei, provocîndu-i o dezvoltare hipertrofică. Celula poate atinge, sub influenţa acestor ioni, asemenea dimensiuni, încît membrana cedează şi celula se dizolvă. Această dizolvare ar pune în libertate elementele bacteriene invizibile, forme bacteriene precelulare, care, conform concepţiei lui O. B. Lepeşinkaia sînt capabile să evolueze spre forma normală a speciei sau spre forme înrudite.

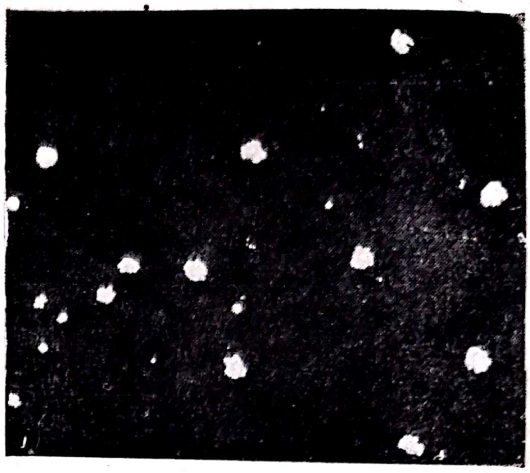


Fig. 24 — Colonii atipice de stafilococ produse sub influenţa bacteriofagului

Bacteriofagul este un generator de variante de prim ordin. Modificări asemănătoare celor ce se produc sub influenţa ionilor de litiu iau naştere şi sub influenţa bacteriofagului. Tumefacţia celulară este un fenomen care precedează constant liza bacteriofagică. Fenomene fizice care modifică permeabilitatea membranei bacteriene intervin şi într-un caz şi în altul. Bacteriofagul, ca şi ionii de litiu este, în general, activ într-un mediu uşor acid, ceea ce arată încă o dată importanţa factorilor fizici asupra fenomenelor care provoacă modificările de formă ale celulelor bacteriene. Transformări de ordin cultural se produc frecvent la bacterii sub influenţa principiului litic. Formele culturale S se transformă în R; culturile, obişnuite nemucogene, pot deveni mucogene după un contact cu bacteriofagul respectiv. Bordet şi Ciucă (1921) au obţinut, dintr-o tulpină de colibacili obişnuită, prin contactul ei cu bacteriofagul, o variantă mucogenă care a păstrat acest caracter timp de peste 30 de ani. M. Ciucă notează însă că nu orice tulpină suferă asemenea transformări sub influenţa bacteriofagului, ci numai unele din ele. Acest lucru, după cum observă M. Ciucă şi colaboratorii (1945/47), este valabil şi pentru *Salmonella*. Astfel, din 16 tulpini de *Salm. typhi murium*, supuse acţiunii bacteriofagului, numai patru au dat va-

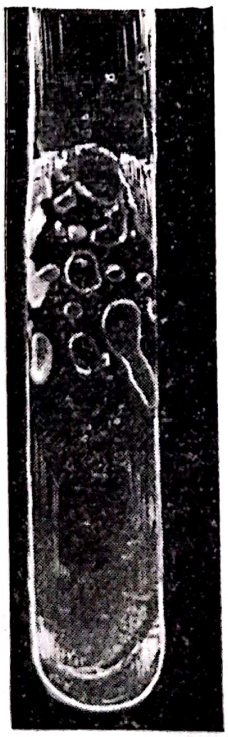


Fig. 25 — Colonii mucogene de *Salmonella suipestifer* conţinînd germeni lizogeni, dezvoltate pe zonele de liză bacteriofagică

riante mucoase (uleioase), din cinci tulpini de *Salm. suipestifer* numai una şi din trei de *Salm. typhosa* niciuna. Intervin, în acest proces de variaţie, şi alţi factori, care nu pot fi încă precizaţi. Este de amintit că variantele mucogene au o activitate enzimatică mai redusă ca formele nemucogene din care provin. În această privinţă s-a mai dovedit că bacteriile, în prezenţa bacteriofagului, îşi reduc, de exemplu, parţial sau total, capacitatea lor zaharolitică, dar îşi măresc activitatea reductoare (Klein şi Sur-Sult).

Printre factorii generatori de variante trebuie socotite şi diverse lichide de origine animală, aşa cum a arătat N. Stamatin pentru tulpinile virulente de bacili ai cărbunelui.

Antibioticele pot fi şi ele generatoare de variante bacteriene. M. Ciucă (1951) semnalează, în această privinţă, că o tulpină de colibacili a dat, în contact cu streptomicina, o variantă mucogenă. Variantele penicilino- şi streptomicinorezistente sînt constituite din germeni care diferă, prin unele din însuşirile lor, de germenii variantei sau speciei din care provin. Astfel, I. Mesrobeanu şi colaboratorii (1950) au obţinut, prin cultivarea stafilococului patogen în prezenţa penicilinei, în cursul a 24 de pasagii, o variantă care a pierdut capacitatea de a fermenta manita şi de a secreta hemolizine şi stafilochinaze. Alte variante, în condiţii similare, pierd pigmentaţia de origine (aurie) şi secretă un pigment citrin. Autorii mai constată că tulpinile penicilinorezistente de stafilococ, degradate prin contactul prelungit cu penicilină, sînt lizate de lizosimă. Aceste diverse date arată că variantele la bacterii ca şi la celelalte vieţuitoare se produc sub influenţa factorilor de mediu, stau sub dependenţa acestor factori. Această relaţie strînsă dintre vieţuitoare şi mediul lor ambiant este logică, se sprijină pe un material documentar extrem de bogat şi se încadrează în teoriile generale progresiste privind proprietăţile materiei vii. Mediul, conform acestor teorii, nu are numai rolul de a selecţiona variantele care apar sub influenţa factorilor ereditari, dar el creează asemenea variante, creînd o nouă ereditate. Concepţia miciurinistă a unităţii fiinţelor vii cu mediul ambiant a dat roade nu numai în ameliorarea plantelor şi animalelor, dar şi în obţinerea unor variante microbiene utile omului. Asemenea variante, este drept, au fost obţinute încă de la începutul erei bacteriologice de către o serie de cercetători, în frunte cu Pasteur, dar domeniul acesta nu a fost suficient de cercetat şi nu s-a ajuns la o epuizare a tuturor resurselor sale din cauză că lumea ştiinţifică, pînă la Miciurin şi Lîsenko, plutea, în această privinţă, într-o incertitudine ideologică. Mulţi microbiologi, stăpîniţi de concepţii învechite, lăsau încă să domnească, în jurul proceselor de variaţie microbiană, umbrele misterului. Ei recunoşteau realitatea proceselor de variaţie dar, crezînd că aceste procese stau sub dependenţa factorilor ereditari şi că nu sînt total subordonate condiţiilor de mediu, nu îndrăzneau să atace problema cu toată vigoarea necesară.

Cercetătorii sovietici, înarmaţi cu concepţia miciurinistă, au abordat această problemă cu curaj şi rezultatele obţinute sînt însemnate. Ei nu mai aşteaptă ca variaţia să se producă singură, la întîmplare, ci supun specia microbiană unor condiţii de mediu care o obligă să se modifice. Ei au introdus, în acest domeniu, concepţia variabilităţii dirijate, variabilitate condusă de experimentator. Imşenetki, de exemplu, a studiat şi pus la punct metoda pentru selecţionarea microbilor fixatori de azot din sol, Pavlenko şi alţii au izolat variante de levuri şi bacterii care pot fi folosite cu bune

rezultate în prepararea vinului, oţetului, produselor lactate etc.

Schimbînd condiţiile naturale de mediu ale unei specii bacteriene, se modifică, consecutiv, metabolismul speciei şi o dată cu metabolismul şi alte caractere morfologice, chimice şi biologice. Modificarea metabolismului este calea pentru a obţine variantele dorite.

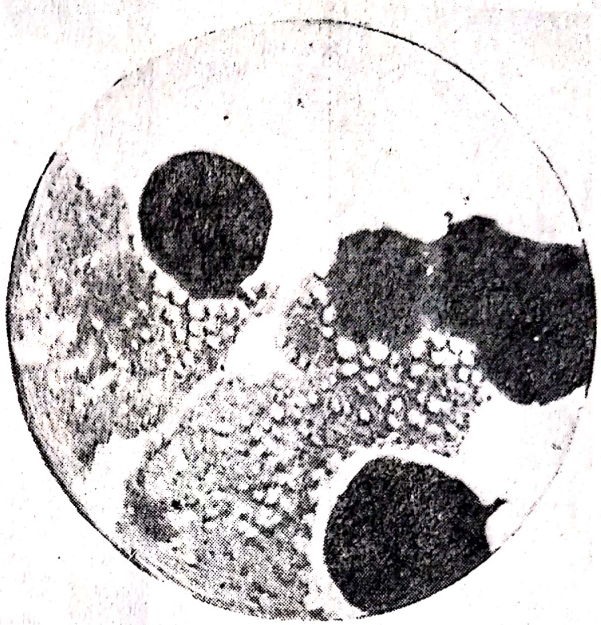


Fig. 26 — Colonii fiice de *Bacillus anthracis* dezvoltate la marginea unei colonii primare

ROLUL COLONIILOR SECUNDARE SAU FIICE ÎN APARIŢIA VARIANTELOR

Numeroşi cercetători au observat că pe suprafaţa coloniilor de pe agar sau de pe alt mediu solid apar, după o incubaţie a cărei durată variază în limite largi de la o specie la alta şi, în cadrul aceleiaşi specii, de la o tulpină la alta şi de la un fel de condiţii de mediu la altul, colonii mici, proeminînd ca nişte butoni pe suprafaţa coloniei iniţial apărute. Colonia iniţială se numeşte primară sau mamă, iar colonia posterior formată, deasupra coloniei primare, se numeşte buton, secundară sau fiică. Unii dintre germenii conţinuţi de coloniile fiice se pot deosebi, prin unele din proprietăţile lor, de germenii prezenţi în colonia primară. Observaţii, în acest sens, au fost făcute de numeroşi cercetători. Preisz, printre primii (1904), a arătat, de exemplu, că unii germeni conţinuţi de coloniile fiice ce s-au dezvoltat pe culturi sporogene de *Bacillus anthracis* sînt asporogeni.

Un studiu amănunţit al relaţiilor dintre coloniile fiice şi apariţia variantelor bacteriene a fost făcut pe tulpinile de *Escherichia coli mutabile* (Neiser, 1906, Massini, 1907, Mellon, 1925). În mod regulat, coloniile fiice ale acestor tulpini, inactive faţă de lactoză, conţineau germeni care, spre deosebire de cei ai coloniilor primare, fermentau lactoza. Asemenea germeni nu se puteau izola din colonia primară. Cercetările făcute ulterior, pe alte specii bacteriene, nu au făcut decît să confirme strînsa legătură dintre aceste colonii de formaţie secundară şi apariţia de noi variante. N. Stamatin a descris, în acest sens, o tulpină de bacili ai tuberculozei umane care forma, pe mediu cu ou, colonii rotunde, lucioase, ceea ce nu constituie aspectul cultural obişnuit al acestui tip, după cum nefermentarea lactozei de către o tulpină de colibacil nu este conformă cu caracterele obişnuite ale speciei *Esch. coli*. La amintita tulpină de bacili ai tuberculozei tendinţa de a forma colonii fiice era foarte accentuată. Acestea apăreau pe culturi vechi de 30 de zile şi erau foarte numeroase ; colonia primară, iniţial netedă, se acoperea, după acest interval de timp, de numeroase mameloane, butoni, din care în mod regulat se izola o variantă, care, spre deosebire de tulpina-mamă, nu mai pigmenta lichidul lui Sauton şi, fapt im-

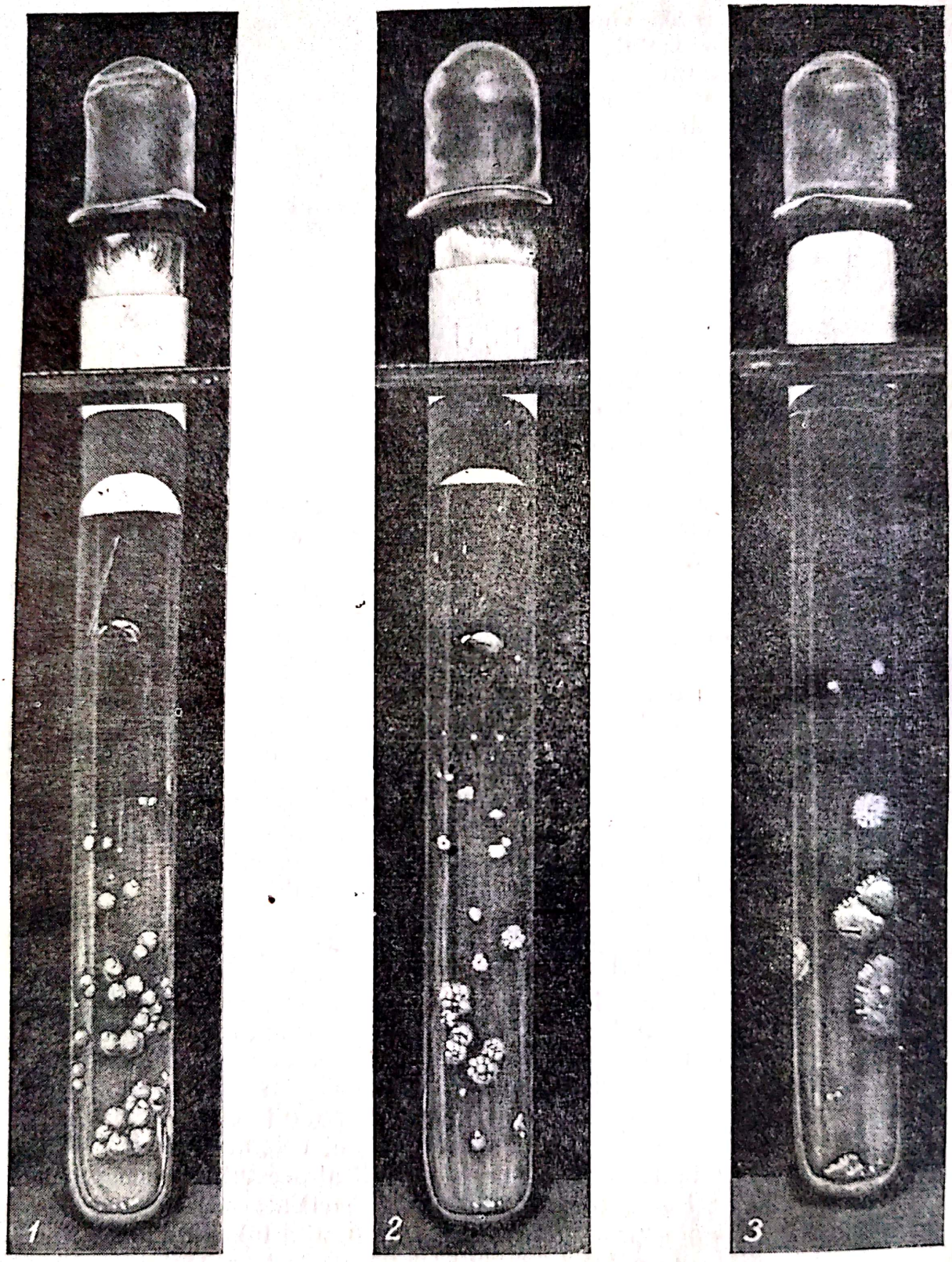
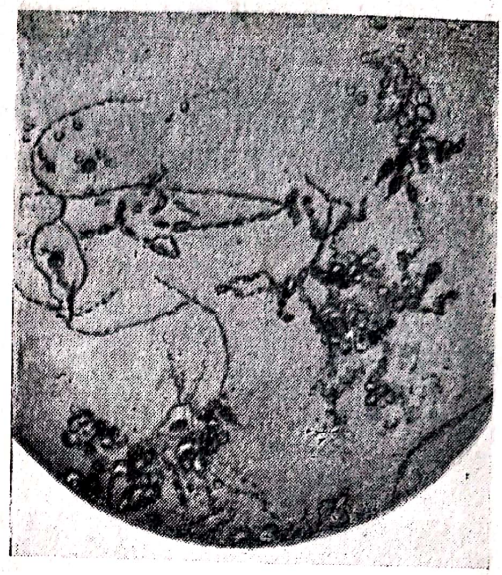


Fig. 27 — Culturi de *Bacillus tuberculosis* pe mediu cu ou

1 — colonii primare fără colonii secundare (fiice sau buton); 2 — colonii primare acoperite cu numeroase colonii fiice (buton); 3 — colonii primare; una din coloniile primare prezintă pe suprafaţă o colonie fiică

Scanned with OKEN Scanner

portant, nu mai forma colonii fiice. Din colonia primară se izola totdeauna tulpina-mamă care pigmenta lichidul Sauton şi forma colonii fiice. Fenomene asemănătoare a observat N. Stamatin la o tulpină asporogenă de bacilul cărbunelui. Această tulpină forma, pe agar, colonii opace, care, învechindu-se, se plisau, se încreţeau; germenii erau foarte fragili şi, în colonia primară, mureau în 10 zile; deasupra coloniei primare apăreau însă, cam la a 10-a zi, colonii fiice în care germenii se conservau cîteva luni de zile; populaţia acestor colonii era constituită din două feluri de germeni: unii asemănători cultural şi morfologic cu cei din cultura-mamă, alţii aveau alt tip şi anume formau pe agar colonii transparente, de dimensiuni mai importante ca cele produse de germenii coloniilor opace. Cum germenii coloniei primare, în momentul transplantării coloniei fiice, erau sigur morţi (transplantarea se făcea după 1 sau 2 luni şi germenii primari mureau după 10 zile) rezultă, în mod neîndoielnic, că germenii coloniilor transparente erau de formaţie secundară, că luau naştere în colonia secundară.



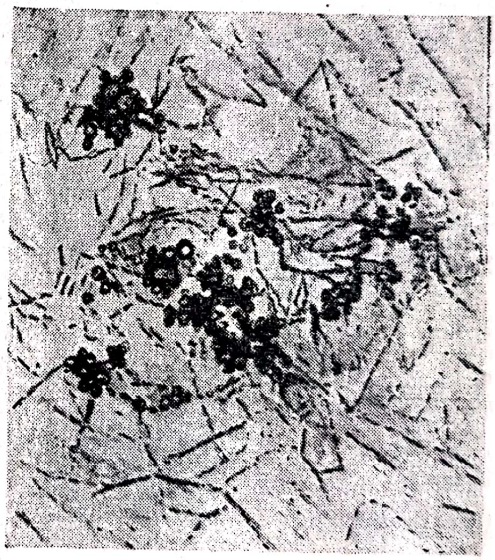


Fig. 28 — Aspecte morfologice ale germenilor de *Bacillus anthracis* din colonii fiice
Imagine microscopică (ob. imersie)

O. Popa şi A. Popovici (1950) observă, la fel, că tulpinile de stafilococi formează pe agar colonii fiice în care viabilitatea germenilor este mult mai mare ca a celor din colonia primară.

N. Stamatin admite că această disjuncţie a caracterelor observată şi pusă în evidenţă, în mod clar, la tulpina asporogenă de *Bacillus anthracis* rezultă printr-un proces de conjugaţie. Conjugaţia s-ar produce în stratul cultural primar; produşii care rezultă din acest proces s-ar dezvolta luxuriant şi ar da excrescenţele culturale pe care le întîlnim la diverse bacterii şi care se numesc colonii fiice. În sprijinul acestei ipoteze vin şi constatări de ordin morfologic; într-adevăr, în colonia fiică, la *Bacillus anthracis*, se întîlnesc cele mai bizare aspecte morfologice: coci mici, forme rotunde, mase protoplasmatice lipsite de structură etc. Aceste forme sînt perfect transplantabile. Este de presupus că această multiplicitate de forme face legătura între elementele ieşite din procesul de conjugaţie şi forma bacteriană normală. Polimorfismul germeni-

lor care formează colonia secundară a fost remarcat, de altfel, la alte specii, de alţi cercetători. Prokovskaia (1930), de exemplu, pune în evidenţă, în elementele conţinute de coloniile secundare ale bacilului pestei umane, o substanţă cromatică cu aspect compact care, sub acest aspect, nu se întîlneşte la celulele bacteriene din coloniile primare.

Scanned with OKEN Scanner

RĂSPÎNDIREA ŞI ROLUL BACTERIILOR ÎN NATURĂ

Bacteriile ca şi alte microorganisme, în special actinomicetele şi ciupercile, sînt foarte răspîndite în natură, ele constituind un înveliş continuu la suprafaţa pămîntului şi în apele de la suprafaţa pămîntului. Oriunde ne-am deplasa pe pămînt vom găsi bacterii. Ele sînt prezente în sol, în apele dulci şi sărate, la suprafaţa apelor, ca şi în mîlul din fundul oceanelor, în aer, pe corpul plantelor şi animalelor.

Tubul digestiv al omului şi animalelor constituie, alături de sol, locuri în care bacteriile se multiplică şi există în cantităţi imense.

„...Microbii există — scrie O m e l e a n s k i (1931) — pretutindeni; miliarde de microbi populează constituenţii naturii şi ne înconjoară pretutindeni. Ele însoţesc, în mod invizibil, pe om, în tot drumul vieţii, influenţînd puternic viaţa lui, fie ca duşmani, fie ca prieteni. Ei se găsesc în cantităţi imense în alimentele pe care le mîncăm, în apa pe care o bem, în aerul pe care îl respirăm. Obiectele care ne înconjoară, îmbrăcămintea noastră, suprafaţa corpului nostru conţin cantităţi imense de microbi".

Să cercetăm răspîndirea bacteriilor şi microbilor, în general, în principalii constituenţi ai naturii, ca solul, apa etc., precum şi în diverse materii organice — lapte.

MICROFLORA SOLULUI

Straturile superficiale ale solului conţin microbi. Numărul lor variază de la un sol la altul, dar ei nu lipsesc din nici un sol. I s a c e n k o (1934) a studiat solurile insulelor din jurul Polului Nord (paralela 79°) şi a găsit în ele cantităţi mari de microbi. Procesele de nitrificare şi denitrificare, de fermentare a ureei sau a albuminelor, de descompunere a celulelor şi grăsimilor etc. se fac, în aceste soluri, ca şi în cele din zona temperată, de către microbi. Nisipurile din pustiuri, cum sînt cele din Sahara, conţin şi ele un număr însemnat de microbi. Microbii duc, chiar în aceste soluri, o viaţă vegetativă, adică se multiplică.

Scanned with OKEN Scanner

Natura florei microbiene din sol este variată ; se găsesc, în mod constant, şi în număr mare, bacterii, actinomicete, ciuperci şi protozoare. În procesele active de transformare a materiei solului, bacteriile, actinomicetele şi ciupercile au rolul cel mai important şi de aici atenţia deosebită ce s-a acordat bogăţiei solului în astfel de microbi. Diverşi cercetători s-au ocupat de această problemă, stabilind numărul de microbi din sol în raport cu natura solului, profunzimea, anotimpul etc.

Astfel, în funcţie de natura solului, S t e p a n o v a a constatat, de exemplu, că cernoziomul din Ucraina (regiunea Kameneţ-Podolsk) conţine pînă la 4,771 miliarde de bacterii pe 1 g de sol, în timp ce, în aceeaşi regiune, solul de pădure conţine 1,219 miliarde de germeni pe 1 g, solul nisipos 2,854 miliarde, iar cel argilos numai 211 milioane. Natura florei variază, la fel, în raport cu solul. Tot S t e p a n o v a a stabilit că un sol de lucernă conţine 2,669 miliarde de germeni pe 1 g, din care 2,5 236 miliarde sînt coci, 66,5 milioane bacili şi 78,9 milioane germeni din grupul *Azotobacter,* în timp ce în solul nisipos din 2,854 miliarde de bacterii, 1,460 miliarde sînt coci, 1,390 miliarde bacili şi numai 4 milioane sînt germeni din grupul *Azotobacter.* La noi în ţară, în cadrul Institutului de cercetări agronomice, O t o p e a n u a determinat numărul şi natura microbilor pentru o serie de soluri. Cifrele găsite de autor sînt consemnate în tabelul 19.

Tabelul 19

Natura microbilor, numărul lor, precum şi capacităţile fixatoare de azot, de amonificare şi de nitrificare a diverselor soluri din R.P.R. (după **Otopeanu**)

Numărul probei de sol	Bacterii şi actinomicete	Bacterii sporulate	Ciuperci	Azobacter	Umiditate	Capacitate fixatoare de N	Capacitate de amonificare	Capacitate de nitrificare
						în procente		
500	8 200 000	1 100 000	31 500	26	1,61	8,62	49,75	1 281
551	8 800 000	1 620 000	22 000	0	1,75	0,17	48,62	875
553	13 700 000	2 600 000	38 000	127	2,66	16,92	35,81	1 092
558	7 200 000	1 000 000	36 500	1	1,45	0,26	55,99	371
562	14 500 000	2 200 000	40 000	548	2,04	13,71	37,67	1 840
564	12 000 000	2 500 000	30 000	607	2,04	14,91	37,97	1 218
566	8 600 000	1 740 000	29 000	498	1,66	13,05	58,61	1 288
568	4 200 000	1 270 000	15 000	8	1,11	2,18	50,57	1 029
570	8 200 000	1 390 000	26 000	0	3,43	0,00	72,08	1 816
571	5 200 000	1 300 000	29 500	1	1,78	0,57	48,61	2 607
573	6 500 000	1 100 000	24 000	126	3,19	15,26	79,88	1 956
575	10 300 000	2 600 000	55 000	6	2,27	3,85	72,00	2 060
577	9 900 000	1 960 000	30 000	801	3,13	12,88	72,21	2 061
580	2 400 000	700 000	35 000	87	4,15	12,10	55,47	676
602	7 000 000	1 600 000	54 000	238	5,00	12,37	51,07	2 548
T. II	2 700 000	740 000	21 000	0	2,89	0,76	66,88	1 446

Bacteriile sînt foarte numeroase la suprafaţă, dar numărul lor se reduce în raport cu profunzimea, aşa cum reiese din tabelul 20.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 20

Numărul microbilor în diverse straturi pentru diverse soluri (după **A. A. Richter şi V. A. Richter**)

Profunzimea de la care s-au recoltat probele în cm	Pămînt de pădure	Pămînt nisipos	Pămînt castaniu
	În milioane pe 1 g de pămînt		
Suprafaţă	2 987	1 544	970
10	1 818	910	757
20	709	—	514

Din tabelul 20 reiese că, deja la 20 cm adîncime, numărul bacteriilor s-a redus de la 2,987 miliarde la 709 milioane în cazul solului de pădure şi la 0 în cazul solului nisipos. Variaţii se constată şi în raport cu diversele anotimpuri ale anului. În general, flora microbiană a solului este mai redusă în luna mai în raport cu luna iulie.

Tabelul 21

Numărul microbilor în diverse perioade ale anului, în solul din Orlovsk calculat după metoda plăcilor (după **Naumova**)

Numărul total		Azotobacter		Coci		Bacili		Drojdii		Protozoare	
18. V	8. VII	18. V	8. VII	18. V	8. VII	18. V	8. VII	18. V	8. VII	18. V	8. VII
În milioane pe 1 g de pămînt											
281,9	499,3	38,2	49,9	137,3	269,6	103,5	175,5	2,2	3,6	0,7	0,7
209,2	448,7	27,7	41,1	171,1	229,9	11,7	174,1	—	2,2	0,7	1,4
285,8	466,3	36,9	47,0	160,0	254,3	80,4	152,1	2,2	2,2	—	0,7
252,1	461,3	29,1	48,2	180,4	241,1	36,1	170,6	2,2	1,4	0,7	—

Otopeanu a determinat, pentru solurile din ţara noastră, variaţii privind numărul de germeni în raport cu adîncimea şi sezonul, aşa cum se vede în tabelul 22.

Tabelul 22

Numărul de bacterii şi actinomicete la diferite adîncimi şi diferite sezoane (după **Otopeanu**)

Adîncimea	Primăvara	Toamna	Vara	Vara	Septembrie
0—10 cm	10 600 000	7 870 000	10 151 000	9 634 000	9 085 000
10—20 cm	6 560 000	6 525 000	7 437 000	7 429 000	8 070 000
20—30 cm	980 000	1 320 000	4 732 000	3 328 000	5 110 000
30—40 cm	626 000	5 920 000	1 270 000	942 000	536 000

În sol se găsesc şi microbi patogeni. Unii din aceşti microbi îşi au sediul obişnuit în sol şi de aici ajung, accidental, în organismul uman sau animal, producînd stări morbide. În acest grup intră bacilul tetanosului, bacilul antraxului, bacilii gangrenei gazoase. Alţi germeni nu-şi au sediul

Scanned with OKEN Scanner

obișnuit în pămînt, ci ei ajung numai accidental aici. Astfel, sînt diversele bacterii Gram negative, unii coci sau chiar unele virusuri. Durata păstrării acestor diverși microbi în sol variază atît de la o specie la alta, cît și de la o condiție de mediu la alta. Astfel, unii microbi se păstrează mult timp în sol, alții foarte puțin. În general, rezistența acestor microbi în mediul ambiant este mai mare iarna ca vara.

MICROFLORA APEI

Bacterii se găsesc, de regulă, în toate apele de la suprafață și numai rare izvoare sînt în momentul ieșirii la suprafață sterile. O dată venite însă în contact cu aerul atmosferic și cu straturile superficiale ale solului, bacteriile pătrund și în aceste ape, unde pot găsi chiar condiții pentru multiplicarea lor. Astfel, o apă de izvor poate conține doar cîteva bacterii pe 1 ml cînd iese la suprafață ; lăsată într-o cameră se îmbogățește în germeni și după 24—48 de ore ea poate conține cîteva sute sau mii de germeni pe 1 ml. Acești germeni sînt în parte căzuți din aer, dar, în mare parte, ei s-au multiplicat în apă. Numărul de bacterii conținute de diversele ape variază în limite foarte largi. Apele de izvor conțin, în momentul ieșirii la suprafață, 5—10—20 de germeni pe 1 ml, iar apa rîurilor, la ieșirea din orașe, poate conține pînă la cîteva sute de mii sau chiar milioane pe 1 ml. Între aceste extreme se situează bogăția în germeni a altor ape. Conținutul în bacterii al unei ape este în funcție, în primul rînd, de materia organică pe care o conține ; cu cît acest conținut este mai mare, cu atît și numărul bacteriilor este mai însemnat. Pentru acest motiv, apa rîurilor conține mai multe bacterii la ieșirea din centrele populate decît la intrare. Rîul Ural, după R a z u n o v, conține, de exemplu, pînă la 400 000 de bacterii pe 1 ml la ieșirea din orașe și numai 197 000 între centrele populate. În apa lacurilor, bacteriile sînt mai numeroase în apropierea malului decît în punctele depărtate de mal și cu atît mai puține cu cît punctul este mai depărtat de mal. Numărul de germeni în apele de suprafață este în funcție și de starea timpului și de sezon. El este mai mare în zilele ploioase ca în zilele cu soare și mai mare vara, ca iarna. Apele sărate ale oceanelor conțin bacterii în toată adîncimea lor și chiar în straturile abisale, la o profunzime de 10 000 m. Aceste bacterii de pe fundul oceanelor se dezvoltă numai la presiuni înalte (se numesc pentru acest motiv bacterii barophile) și la temperaturi scăzute, 2—3°C. În Oceanul Atlantic, apa de la 200 m adîncime conține de la 3 la 789 de bacterii pe 1 ml, iar la 400 m adîncime se găsesc 46—221 de bacterii pe 1 ml. În apele oceanelor din jurul Polului Nord, bacteriile sînt prezente atît la suprafață, cît și la adîncime. L e v i n (1899), de exemplu, în apele din jurul Groenlandei, găsește bacterii în apa recoltată de la 25 m, precum și în cea luată de la 2 700 m adîncime ; în apa de la 25 m adîncime găsește 15 bacterii în 60 ml de apă, iar în cea de la 2 700 m, 39 de bacterii în 51 ml. Bacteriile găsite aveau forma rotundă, bacilară și spiralată.

Cercetătorii sovietici, aplicînd metoda preconizată de B a r s o v (1932) de germinație a ultrafiltratelor cu membrană, au găsit încă concentrații și mai mari în germeni în apele mărilor care înconjoară U.R.S.S.. K r i s s (1952) găsește în larg, în straturile superficiale ale Mării Caspice, 40 000—500 000 de bacterii pe 1 ml, iar la vărsarea Volgii 170 000 pe 1 ml.

Scanned with OKEN Scanner

Tot în Marea Caspică, însă la 4 000 m adîncime, acelaşi autor găseşte 50 000—180 000 de bacterii pe 1 ml. Tot Kriss remarcă că densitatea în bacterii a apelor oceanelor nu este uniformă şi că există aşa-numitele focare microzonale în care numărul bacteriilor este foarte mare.

Mîlul din fundul oceanelor conţine, la fel, bacterii : 1 g de mîl conţine după Kalinenko 63 de bacterii. Mîlul de pe coasta californiană, la 2—300 m adîncime a apei, conţine, pe 1 g 100 000—1 000 000 de bacterii denitrifiante, 10 milioane de bacterii reductoare de sulfaţi şi 1 000—10 000 de bacterii nitrifiante. Bacterii denitrifiante, în număr mare, se găsesc în Marea Neagră sub stratul de hidrogen sulfurat, iar în mîlul acestei mări sînt numeroase sulfobacterii (pînă la 10 milioane pe 1 g). În profunzimea mîlului marin numărul bacteriilor se reduce, astfel că la 1—2 m adîncime bacteriile sînt absente.

Mîlul rîurilor conţine numeroase bacterii — 225 000 pe 1 g, după Ierusalimski. Acest număr este ridicat însă numai la suprafaţa fundului apei, căci de îndată ce se pătrunde mai adînc el scade. Astfel, după Fedorov, 1 g de mîl recoltat de la suprafaţa fundului unui lac conţine 1,445 miliarde bacterii, la 2 cm nu se mai găsesc pe 1 g decît 5 500 de bacterii, iar la 5 cm ele lipsesc cu desăvîrşire. Bacteriile par a constitui o peliculă pe suprafaţa fundului apei.

Conţinutul în germeni al apelor din puţuri şi bazine variază în raport cu adîncimea puţului sau bazinului. Cu cît puţul este mai adînc, cu atît apa sa conţine mai puţine bacterii şi acest lucru este lesne de înţeles. Într-adevăr, în straturile profunde ale solului sînt foarte puţini microbi, în timp ce în straturile superficiale ei sînt foarte numeroşi şi, în acest din urmă caz, pătrund din sol în apă, îmbogăţind-o în microbi. Conţinutul în microbi al apelor din puţuri şi bazine mai este în funcţie şi de modul cum sînt construite şi întreţinute puţurile şi bazinele. În apele puţurilor deschise din care apa se scoate cu găleata şi în care apele din jurul puţului se scurg direct în puţ, fără a fi filtrate prin straturile de pămînt care separă suprafaţa apei de suprafaţa pămîntului, desigur că se vor găsi foarte mulţi microbi şi de aceea aceste puţuri sînt neigienice.

Apele care conţin mulţi microbi trebuie înlăturate din consumaţia omului şi animalelor chiar dacă microbii existenţi nu sînt patogeni, căci prezenţa unui mare număr de germeni într-o apă arată că bazinul ori puţul respectiv este în contact direct cu o sursă de infecţie de suprafaţă : grajd, closet etc. În aceste condiţii, pot ajunge în apă şi germeni patogeni provenind de la purtători animali sau umani. Apa, într-adevăr, este o sursă de infecţie în multe cazuri. Astfel, febra tifoidă şi dizenteria la om, morva, antraxul etc. la animale, au adeseori o origine hidrică.

Aceste motive au făcut să se acorde o deosebită atenţie examenului bacteriologic al apelor, determinării cantitative şi calitative a germenilor conţinuţi pe unitatea de volum. Din punct de vedere calitativ, colibacilul prezintă cea mai mare importanţă şi prezenţa şi numărul de colibacili dau cele mai precise indicaţii cu privire la calitatea apei.

TEHNICA ANALIZEI BACTERIOLOGICE A APEI

Studiul bacteriologic al apei comportă următoarele faze :

1. recoltarea şi transportul apei la laborator ;
2. analiza cantitativă a germenilor din apă ;

3. analiza calitativă a apei.

1. **Recoltarea şi transportul apei la laborator.** Sticlele pentru recoltarea apei trebuie să aibă o capacitate de 100—200 ml şi să fie în prealabil curăţite cu apă şi nisip, apoi cu apă şi cenuşă şi, în fine, cu soluţie caldă de 1% carbonat de sodiu. După aceea vor fi spălate timp îndelungat (10 minute) cu apă de robinet, apoi uscate şi sterilizate fie la autoclav sau pupinel, fie prin fierbere (30 de minute la 100°C).

Recoltarea apei din profunzimi se face într-o sticlă prevăzută cu un dispozitiv care să permită scoaterea apei de la o adîncime de cel puţin 2 m de la suprafaţă.

Apa de robinet se recoltează după o prealabilă flambare a robinetului şi după ce se lasă să curgă timp de aproximativ 10 minute, pentru îndepărtarea apei stagnante din conductă.

Transportul la laborator se face în cutii izolante cu o temperatură de 6—10°C.

Fiecare probă de apă este etichetată şi însoţită de o fişă în care se precizează: locul de recoltare, data şi ora recoltării, proveniența apei (conductă, pompă, fîntînă deschisă, rîu, felul de construcţie al fîntînii etc.), iar la laborator se va nota data şi ora primirii probei de apă.

Transportul apei nu trebuie să dureze mai mult de 10 ore pentru o apă socotită pură (clorinată) şi 6 ore pentru o apă impură.

2. **Analiza bacteriologică cantitativă.** Pentru a aprecia numărul total de germeni dintr-o cantitate anumită de apă, se procedează la însămînţarea sa pe geloză în plăci Petri.

Numărătoarea pe geloză. Se agită flaconul cu apă de circa 25 de ori înainte de însămînţare. Se pipetează cantităţi de 1 ml şi 0,1 ml de apă în două serii de plăci Petri. In cazul unei ape foarte poluate se fac însămînţări cu diluţii mai mari 1/100, 1/1 000, 1/10 000. Diluţiile se fac cu apă sterilă de robinet.

Peste apă se toarnă în plăcile Petri 10—15 ml geloză 2% topită şi răcită la 45°C. Se amestecă bine apa cu geloză. Se lasă să se solidifice. O serie de plăci se încubează la 37°C, iar cealaltă serie rămîne la temperatura camerei, într-un loc întunecos. Numărarea coloniilor se face după 48 de ore.

Numărul de colonii găsite se raportează la 1 ml şi apoi se face media.

Interpretarea rezultatelor. Se admit, în general, ca valabile, următoarele interpretări: 0—1 000 de germeni pe 1 ml pentru apa bună de băut (potabilă), 1 000—10 000 de germeni pe 1 ml pentru apa mediocră (dacă nu conţine şi bacili coli, potabilă).

Apa cu peste 10 000 de germeni pe 1 ml se consideră nepotabilă.

3. **Analiza bacteriologică calitativă.** Examenul urmăreşte cercetarea germenilor din grupul coli şi se face în felul următor: se însămînţează, în tuburi care conţin 10 ml de bulion lactozat 0,5% şi care sînt prevăzute cu tuburi de fermentaţie:

10 ml de apă, în două tuburi,

1 ml de apă, în două tuburi,

0,1 ml de apă, în două tuburi.

Pentru apele din puţuri, se mai însămînţează cîte două tuburi cu cîte 1 ml din diluţiile 1/100, 1/1 000, în apă sterilă de robinet.

Se incubează la 37°C timp de 24—48 de ore.

Proba este socotită negativă cînd nu se dezvoltă gaze după o incubaţie de 40 de ore.

Dacă se dezvoltă gaze, se fac însămînţări pe medii speciale lactozate — Drigalski, Endo sau alte medii similare — în vederea izolării şi identificării germenului gazogen.

Interpretarea generală a rezultatelor obţinute prin numărătoare. In lotul de tuburi în care s-au dezvoltat gaze se face proporţia între numărul cel mai mic de colibacili şi cantitatea de apă însămînţată, iar apoi se raportează la 1 000 ml de apă.

Scanned with OKEN Scanner

De exemplu:

Dacă se dezvoltă gaze în ambele tuburi însămînţate cu cîte 10 ml de apă, se socoteşte că 10 ml conţin cel puţin un colibacil.

Deci, la 1 000 ml de apă . . . . . 100 de colibacili.

— Dacă se dezvoltă gaze numai într-un tub însămînţat cu 10 ml de apă, înseamnă că 20 ml conţin un colibacil.

Deci, la 1 000 ml de apă . . . . . 50 de colibacili.

— Dacă se dezvoltă gaze în ambele tuburi însămînţate cu cîte 1 ml apă, înseamnă că 1 ml de apă conţine un colibacil.

Deci, la 1 000 ml de apă . . . . . 1 000 de colibacili.

In mod similar, se fac calculele şi pentru celelalte diluţii.

Aprecierea apei în raport cu numărul de colibacili găsiţi

10 — 50	de colibacili la 1 000 ml	apă bună
50 — 200	„ „ „ „ „	apă mediocră
200 — 1 000	„ „ „ „ „	apă suspectă
peste 1 000	„ „ „ „ „	apă rea

Apa de conductă (clorinată) nu trebuie să conţină colibacili.

Apele impure se pot purifica, operaţie care se poate realiza prin filtrare sau tratare cu antiseptice, în doze care nu sînt nocive pentru om şi animale.

MICROFLORA AERULUI

Aerul conţine microbi. Numărul şi natura microbilor din aer variază în raport cu o serie de factori cum sînt altitudinea, latitudinea, natura solului, densitatea florei şi faunei, gradul de umiditate, temperatura, luminozitatea etc. Astfel, în ceea ce priveşte variaţiile numerice ale florei bacteriene în raport cu altitudinea, însuşi P a s t e u r a demonstrat că în aerul regiunilor muntoase numărul microbilor este mult mai mic ca în aerul localităţilor populate.

Numărul bacteriilor scade pe măsură ce ne depărtăm de pămînt. M i ş u ş t i n a arătat, în acest sens, că la 500 m deasupra Moscovei se găsesc 2—3 bacterii pe fiecare litru de aer, la 1 000 m, 1,5 bacterii şi la 2 000 m, 0,5 bacterii pe 1 litru. Bacteriile sînt ridicate însă de curenţii de aer, în straturile superioare ale atmosferei şi chiar la 6 000—7 000 m se mai găsesc încă bacterii. Este foarte probabil că bacteriile pot ieşi din zona de atracţie a pămîntului şi se pot răspîndi, astfel, în spaţiile interplanetare. Bogăţia solului în germeni influenţează, cum este lesne de înţeles, numărul de germeni în aer. In aerul grajdurilor şi al camerelor locuite, în aerul centrelor populate sînt mai mulţi germeni ca în aerul liber; astfel, 1 ml de aer dintr-o încăpere populată (sală de cinematograf) poate conţine pînă la 300 000 de bacterii. Vaporii de apă înlesnesc plutirea germenilor în aer şi, în consecinţă, într-o atmosferă umedă se vor găsi mai mulţi microbi decît într-una uscată. In zonele de aer intens luminate de soare se găsesc mai puţini microbi ca în zonele umbrite. Aerul de deasupra zonelor acoperite de zăpadă, aşa cu a arătat I s a c e n k o, conţine foarte puţini microbi şi, în general, aerul este mai sărac în bacterii iarna decît vara. In zonele polare, aerul este aproape total lipsit de bacterii. L e v i n (1899), care a cercetat din acest punct de vedere aerul din zonele Polului Nord, nu a găsit decît o singură dată o bacterie în 1 000 litri de aer. Numeroase

Scanned with OKEN Scanner

alte încercări au fost însă total negative. Autorul, în vederea determinării conținutului aerului în bacterii, trecea un anumit volum de aer printr-un filtru de vată de sticlă sau de amestec de zahăr și sare de mare și apoi filtrul îl amesteca cu gelatină lichidă. În gelatină, după solidificare și o incubație convenabilă, se puteau dezvolta germenii reținuți pe filtru și numărul coloniilor obținute era socotit egal cu numărul germenilor prezenți în volumul de aer filtrat.

ORIGINEA MICROFLOREI DIN AER

Microbii, în general, nu trăiesc și nu se înmulțesc în aer. Este drept că unii germeni ar putea găsi, uneori, condiții să se multiplice în aer, dar acest mod de viață nu este pentru ei decît un accident. Microbii din aer au altă origine; ei provin din pămînt, din organismele animale sau vegetale, din diversele materii organice etc. și de aici sînt antrenați de curenți în aer și duși pînă la mari înălțimi.

NATURA MICROFLOREI DIN AER

Natura microflorei din aer este foarte variată și această variabilitate este în legătură cu originea acestor microbi, este dependentă deci de sol, de fauna și flora care întreține în aer această microfloră: în aerul de deasupra unui sol bogat în humus se găsește o microfloră mai bogată ca deasupra unui sol nisipos și uscat în care germenii nu găsesc substanțe necesare nutriției lor.

La fel, natura microflorei va fi una în aerul unui oraș situat pe un sol bogat în substanțe organice și alta în aerul unui oraș situat pe un sol nisipos. În primul caz se găsește o microfloră variată cuprinzînd bacterii sporulate și nesporulate, în al doilea caz se găsesc aproape exclusiv numai bacterii sporulate. Microflora din spațiile în care locuiesc oameni poate diferi de a spațiilor în care se găsesc diverse specii animale.

În general, din aer se izolează coci, bacterii Gram negative pigmentate, bacili Gram pozitivi sporulați și diverse specii de ciuperci.

INFECȚII AERIENE

În aer se pot găsi microbi patogeni care pot fi inhalați o dată cu aerul. Ajunși în căile respiratorii și pulmon, ei pot produce infecții. Infecția în tuberculoză se face, adeseori, atît la om cît și la animale, prin intermediul aerului inhalat. În aerul grajdurilor de vaci, în care se găsesc animale tuberculoase, plutesc bacili ai tuberculozei, care ajung o dată cu aerul în aparatul respirator al animalelor sănătoase și le infectează. La om, infecția se face și prin picături de spută, care se elimină mai ales cînd bolnavul vorbește și care pot conține cantități importante de bacili. Infecția cărbunoasă la om și animale — în special la oaie — se poate face prin aerul inspirat. Praful din lîna oilor moarte de antrax și care se împrăștie în aer în timpul scărmănatului conține numeroși spori și inhalat de oameni produce antraxul pulmonar. Infecția în variolă ovină se face tot prin inhalația aerului, care conține particule de virus. Aceste date arată cît este de importantă izolarea bolnavilor în combaterea diverselor infecții. Organismul tuberculos, oaia trecută prin variolă, contaminează aerul.

Scanned with OKEN Scanner

MICROFLORA NORMALĂ A ORGANISMULUI ANIMAL

Bacteriile fiind răspîndite peste tot, este normal ca ele să se găsească pe suprafața organismelor, pe piele și pe mucoase, în uverturile naturale, în căile superioare ale aparatului respirator și pe traiectul tubului digestiv. Numărul și natura germenilor ce se găsesc în aceste diverse locuri variază în raport cu o serie întreagă de factori, cum sînt locul unde se găsește animalul, specia căreia aparține, modul său de viață etc.

Pe suprafața corpului și anume pe piele și pe părul animalelor se găsesc bacterii și cele mai multe se pot izola prin metode obișnuite — culturi în plăci cu agar. Flora cutanată este constituită, atît la om cît și la animale, din bacterii rotunde, coci, în general nepatogeni și pigmentați. Se pot însă izola și coci patogeni. De pe pielea oii, de exemplu, s-au putut izola stafilococi care aparțin tipului ce produce mamita gangrenoasă la oaie. În afară de coci, se mai pot adeseori izola bacterii Gram negative din genul *Proteus, Escherichia* etc.

Pe mucoase și în sacul conjunctival se găsesc bacterii, însă, în general, în număr mic, din cauză că bacteriile care cad din aer pe mucoasa oculară sînt lizate de lizosimă, principiul bacteriolitic prezent în lacrimi.

Flora din cavitățile nazale și bucale este foarte bogată și variată. Ea este constituită din coci, bacterii Gram pozitive sau negative, spirili și spirocheți. În general, această floră este nepatogenă. Totuși, pe lîngă saprofiți, se pot găsi și patogeni. Astfel, în flora nazală și bucală a găinilor se găsesc constant colibacili și, din această cauză, culturile în bulion făcute cu material recoltat din aceste cavități omoară aproape regulat șoarecele pe cale intraperitoneală. În plus, tot în aceste cavități se pot găsi pasteurele care, uneori, au o virulență destul de mare. La porci, în cavitățile nazale și bucale, pe lîngă o floră de suprafață foarte bogată se găsesc adeseori, pasteurele patogene pentru șoarece, iar în amigdale bacili ai rujetului virulenți, precum și pasteurele.

Tubul digestiv și, în special, intestinul gros și materiile fecale conțin o floră foarte variată și foarte bogată. Unii reprezentanți ai acestei flore iau parte activă la procesul de digestie, înlesnind transformarea unor alimente complexe în produși asimilabili. Astfel, în rumen, la ierbivore, se găsesc microorganisme care descompun celuloza în complecși mai simpli și asimilabili de către organismele respective (L e m o v, 1953). Alte bacterii îndeplinesc alte funcțiuni utile organismului în care se găsesc. Există astfel, în intestin, bacterii care, sintetizînd anumite vitamine, suplinesc deficiențele de sinteză ale organismului. La animalele din zonele polare, așa cum relatează L e v i n (1899), intestinul nu conține sau conține puține bacterii. Însămînțările făcute de la numeroase vertebrate și nevertebrate au rămas, într-adevăr, de cele mai multe ori sterile. La două foci și un urs alb, autorul a găsit însă în tubul digestiv o singură specie bacteriană, care i s-a părut a fi un colibacil. Unele specii de păsări conțineau și ele bacterii în intestin și se pare că tot colibacili.

Plecîndu-se de la constatări de acest fel, s-a pus problema funcțiunilor florei intestinale, necesității ei pentru macroorganism. Întîi N e n c k i și apoi N u t a l l și T h i e r f e l d e r (citați de L e v i n, 1899), pentru a rezolva această problemă, au recoltat aseptic, prin operație cezariană, puii de cobai din uterul matern și i-au crescut în condiții de sterilitate. Unul din

aceşti cobai a murit după 8 zile şi intestinul său a fost găsit steril. Autorii deduc că procesele vitale şi în special cele metabolice, cel puţin pentru un timp scurt, se pot defăşura în afara intervenţiei florei bacteriene.

Flora tubului digestiv cuprinde şi specii patogene care, în anumite condiţii, se pot infiltra în organism, producînd stări morbide. Astfel, în intestin, la cai, se găseşte *Shigella equirulis,* care, în stări patologice produse fie de virusul anemiei, fie de ciuperca *Stahybotrys alternans,* pătrunde în organism şi produce tulburări grave. În conţinutul intestinal al porcilor se găseşte frecvent *Salmonella suipestifer,* care, la fel, în condiţii particulare, poate trece din intestin în circulaţia generală, producînd infecţii paratifice. La oi, infecţiile cu anaerobi, *Clostridium oedematiens, Cl. welchii,* sînt, de asemenea, de origine intestinală.

În fine, în vagin la femeie şi într-o mică măsură în uretră la masculi şi femele se găseşte o floră bogată constituită, în general, din coci.

Flora bacteriană care se găseşte pe piele şi în uverturile naturale nu pătrunde şi nu se găseşte în intimitatea ţesuturilor, adică în sînge şi organe. Ea rămîne la aceste porţi, dar nu merge mai departe din cauză că, pe de o parte, ea nu poate traversa învelişul care separă organismele animale de mediul ambiant iar, pe de altă parte, chiar dacă au reuşit să pătrundă în ţesuturi ei nu se pot multiplica aici, ţesuturile vii fiind dotate cu mijloace de apărare antimicrobiană foarte active, în special faţă de germenii saprofiţi.

MICROFLORA NUTREŢURILOR

Plantele au pe suprafaţa lor, în mod constant, bacterii care provin, de cele mai multe ori, din pămînt şi care, în consecinţă, sînt constituite din coci, bacili sporulaţi, diverse ciuperci etc. După moartea plantelor, cadavrele lor sînt dezintegrate de diverse microorganisme şi, în general, de ciuperci. Acţiunea de dezintegrare este înlesnită de umezeală. Într-adevăr, pe paiele ţinute în ploaie este uşor de constatat apariţia, pe suprafaţa paiului, a unor formaţii rotunde diferit colorate, care nu sînt altceva decît colonii de ciuperci. Unele din aceste ciuperci sînt saprofite, altele, dimpotrivă, sînt patogene şi consumul sau contactul cu asemenea furaje poate produce diferite stări morbide la animale. Astfel, ciuperca *Stahybotrys alternans* care se găseşte în paiele mucegăite produce o boală gravă la cabaline, iar unele ciuperci din genul *Aspergillus* produc infecţii la puii de găină sau de curcă, bobocii de gîscă etc.

În anumite condiţii, cum sînt cele care se găsesc în silozuri, se dezvoltă în furaje microorganisme care imprimă acestora modificări utile în sensul că furajele nu-şi pierd valoarea lor nutritivă şi mai mult încă, ele capătă un gust plăcut, acrişor, datorită produşilor (în special, acid lactic) care rezultă în cursul proceselor fermentative. Bacteriile care produc asemenea modificări fac parte din grupa lactobacteriaceelor, adică a bacteriilor producătoare de acid lactic, cum sînt *Lactobacillus thermophilus* care se dezvoltă la temperaturi mai mari de 50°C, *Streptococcus acidi lactici,* care are optimum de dezvoltare la temperatura de 38—40°C, *Lactobacillus delbrückii,* care are optimum de dezvoltare la 45—48°C etc. Tot în furaje însilozate se mai pot găsi, ca floră nedorită, bacterii butirice cum sînt *Clostridium saccharobutyricum şi Cl. tyrobutyricum* şi altele. Speciile din acest ultim

grup sînt anaerobe şi butirice. Ele dau alimentelor un gust şi un miros dezagreabil şi de aceea trebuie înlăturate. În silozuri, în condiţii bune de însilozare, ele sînt înlăturate de flora bacteriilor din grupa lactobacteriaceelor. Acestea acidifiază mediul la un pH de 3—4, pH la care flora butirică nu se poate dezvolta. În plus, în silozuri. în cursul fermentaţiilor, temperatura se ridică la 45—50°C, ceea ce constituie un optimum de dezvoltare pentru lactobacteriacee, dar care împiedică dezvoltarea bacteriilor butirice sau a unor bacterii patogene.

Bacteriile din genul *Escherichia* se pot găsi şi ele în furaje incorect însilozate. Aceste bacterii produc fermentaţia albuminelor şi hidraţilor de carbon, fermentaţii care nu sînt de dorit, deoarece ele reduc valoarea alimentară a furajelor şi modifică, în sens nedorit, gustul şi mirosul.

Dintre bacteriile patogene, în furajele însilozate se poate dezvolta *Clostridium botulinicum* a cărui toxină este patogenă pentru animalele domestice şi pentru om.

MICROFLORA GUNOIULUI

Gunoiul de grajd este iniţial constituit din paie şi dejecţii animale (materii fecale şi urină) şi el conţine, chiar în momentul ridicării sale din grajd, o floră foarte bogată şi variată. În platformă sau în grămada de bălegar componentele iniţiale ale gunoiului — celuloza, ureea, albumina şi alte substanţe — sînt dezintegrate şi transformate în produşi mai simpli. Aceste transformări se fac sub influenţa numeroaselor microorganisme prezente în gunoi. 1 g de gunoi conţine, după S t e p a n o v a , pînă la 60 miliarde de germeni (coci, bacili şi spori). Numărul de germeni variază în raport cu condiţiile de păstrare a gunoiului (la rece, în grămadă sau la platformă) şi cu faza de transformare în care se găseşte. Astfel, iniţial, gunoiul, tot după S t e p a n o v a , conţine, în medie, pînă la 60 miliarde de germeni, pentru a atinge, o dată cu ridicarea temperaturii interne, 71,6 miliarde, iar la sfîrşitul perioadei de conservare să conţină numai 17,5 miliarde de germeni pe 1 g.

Natura florei microbiene este foarte variată şi condiţionată şi ea de modul de conservare. Flora aerobă este constituită din mixomicete din grupul *Cytophaga* şi *Cellvibrio,* precum şi diverşi coci, specii Gram negative *(Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli)* şi Gram pozitive *(Bacillus mycoides, B. mesentericus* etc.). Flora anaerobă a fost identificată de O m e l e a n s k i şi este constituită din speciile *Bacterium cellulosae hydrogenicus* şi altele. În gunoi se găsesc şi bacterii termofile cum este specia *Bact. cellulosae disolvens.* În afară de bacterii, gunoiul conţine numeroase actinomicete şi ciuperci din genurile *Monillia, Cladosporum, Penicillium, Aspergillus* etc.

Flora microbiană desface diverşi componenţi organici din gunoi. Este necesar ca această desfacere să se facă în condiţii care să evite, în cea mai mare măsură, pierderile de azot şi carbon. Carbonul se pierde atunci cînd descompunerea celulozei, precum şi a altor compuşi ai carbonului merge pînă la termenii finali de CO_2 şi apă. Azotul se pierde sub formă de amoniac. Metoda de fermentare care evită cel mai mult asemenea pierderi a fost recomandată de vestitul agrobiolog sovietic V i l i a m s . Ea constă în aşezarea gunoiului în straturi pînă la înălţimea de 2 m şi udarea periodică

Scanned with OKEN Scanner

a grămezii cu purin de grajd. În aceste condiții, se instituie o fermentare aerobă în care pierderile sînt cele mai mici și transformările se fac pînă la termeni care pot fi utilizați de plante. În plus, în gămada de gunoi, se produce, în cursul fermentației, o ridicare a temperaturii care atinge 70—72°C și care duce la distrugerea unei serii întregi de viețuitoare vătămătoare, cum sînt bacteriile patogene, ouăle de tenii, semințele de buruieni etc.

MICROFLORA LAPTELUI

Laptele este steril atîta timp cît se găsește în glanda mamară a unui animal sănătos, dar de îndată ce este muls el se infectează. Infecția se face de pe sfîrcuri, de pe mîna mulgătorului, din aer și din vasul în care laptele este recoltat. Această infecție este cu atît mai mare cu cît se aplică mai puțin măsurile de igienă. Un lapte va conține, îndată după mulsoare, un număr cu atît mai mic de microbi cu cît măsurile de igienă vor fi mai strict aplicate. Cu cît ugerul vacii, mîinile mulgătorului și vasul de recoltare vor fi mai curate, cu atît laptele va fi mai sărac în microbi. La fel, cu cît aerul grajdului va fi mai sărac în microbi, cu atît și laptele va fi mai curat, va conține mai puțini microbi. S-a constatat, în această privință, că 1 ml de aer conține 1 210 000 microbi în timpul repausului și 3 193 000 în timpul distribuirii fînului.

Laptele este cu atît mai igienic, cu cît conține mai puțini microbi și de aceea mulsul trebuie să se facă în condiții care să evite introducerea microbilor în lapte. Prezența și bogăția în colibacili constituie o indicație importantă asupra condițiilor de mulgere și conservare. Cu cît numărul colibacililor este mai mic, cu atît condițiile au fost mai bune și invers. Un progres însemnat s-a realizat, în această privință, prin introducerea mulsului electric, cu aparatura sterilizată. Mecanizarea acestei munci manuale, pe lîngă alte avantaje, asigură obținerea unui lapte mult mai igienic.

Un lapte muls în condiții igienice conține, în medie, cîteva sute de microbi pe 1 ml. Acest număr rămîne constant cîteva ore și uneori chiar scade, ceea ce se datorește puterii bactericide a laptelui. Durata conservării puterii bactericide variază în raport cu viteza cu care se răcește laptele după muls, cu temperatura de răcire și de conservare. Cu cît laptele este răcit mai repede și la o temperatură mai scăzută cu atît puterea bactericidă se conservă mai mult timp. O dată dispărută puterea bactericidă, germenii încep să se dezvolte, atingînd cifre foarte mari. O d a i s k i și B ă i e ș (1934) stabilesc că laptele de pe piață, din București, conține, în medie, 428 744 de germeni pe 1 ml, iar A. I d i c e a n u (1952), examinînd 500 de probe de lapte de la lăptari sau de la ferme, constată că numărul de germeni, pe 1 ml, variază de la 100 000 la 5 784 000 000.

Natura microbilor care se găsesc în lapte este foarte variabilă. Acești microbi pot fi împărțiți în trei grupe și anume: microbi din grupul *Streptococcus acidi lactici* și *Lactobacillus*, microbi accidentali și microbi patogeni.

Microbii din primul grup nu sînt periculoși, ci, dimpotrivă, ei sînt binevenîți în lapte, deoarece produc modificări utile — coagularea laptelui, transformarea sa în produse alimentare de deosebită importanță economică — iaurtul, laptele acidofil etc. Acești microbi sînt izolați în laboratoare și cu culturile pure se prepară, industrial, produsele alimentare respective.

Scanned with OKEN Scanner

Microbii accidentali şi cei patogeni sînt nedoriţi, întîi pentru motivul că ei provoacă modificări nedorite ale laptelui, îi dau miros şi gust neplăcut, iar în al doilea rînd, ei pot produce îmbolnăviri la om şi la animale. Astfel, se citează la oameni numeroase cazuri de febră tifoidă, infecţii streptococice, bruceloase, tuberculose etc., care au avut ca punct de plecare un lapte infectat. La copii, laptele care conţine mulţi microbi poate produce tulburări digestive. La animale, infecţiile bruceloase, tuberculoase se pot transmite printr-un lapte infectat. Tuberculóza la porci se transmite, de regulă, prin lapte tras sau prin zer provenind de la vaci tuberculoase.

Un lapte bun trebuie să provină de la animale sănătoase, să fie muls în condiţii de perfectă igienă şi să fie păstrat în bune condiţii. Laptele de origine necunoscută, pentru a înlătura pericolul pe care îl poate constitui pentru animale şi om, nu trebuie să se consume şi nu trebuie să se prelucreze decît după pasteurizare sau fierbere. Examenul bacteriologic al laptelui se face prin metodele obişnuite (V l ă d e s c u R., 1945).

ROLUL MICROBILOR ÎN TRANSFORMAREA SUBSTANŢELOR ÎN NATURĂ

Materia, care se găseşte în natură, sub diferite aspecte, este într-o continuă mişcare şi transformare. Aceste transformări se fac uneori pe cale fizică sau chimică ; fierul, de exemplu, în prezenţa oxigenului şi a apei se oxidează şi dă oxid de fier, deci un compus al fierului ; operaţia se poate produce şi invers, adică oxidul de fier poate pierde oxigenul transformîndu-se din nou în fier, operaţie care se poate realiza sub acţiunea unui factor fizic şi anume căldura. Celuloza, din lemn şi diverse plante, sub influenţa căldurii se oxidează, arde şi se transformă pînă la urmă în CO_2 şi H_2O. Operaţia inversă, adică a constituirii celulozei din CO_2 şi H_2O este mai grea şi ea nu se realizează încă pe cale chimică, ci numai pe cale biologică, adică în corpul diverselor plante. Această constatare ne arată că, în afară de transformările care se fac în natură sub influenţa factorilor fizici şi chimici, există şi prefaceri care se fac pe cale biologică, adică prin intervenţia materiei vii. Procesele biologice de transformare se petrec pe scară întinsă pe planeta noastră, unde biosfera este extrem de bogată. Se constată, în această privinţă, că circuitul în natură al unor elemente preţioase materiei vii cum sînt azotul şi carbonul se face, în mare parte, cu concursul vieţuitoarelor, în special al bacteriilor, actinomicetelor şi ciupercilor. In absenţa acestor vieţuitoare, s-ar fi putut ca ciclul acestor elemente esenţiale să se rupă şi ca să se ajungă la înmagazinarea lor în complecşi chimici inutilizabili. Intr-adevăr, dacă, de exemplu, fenomenul de putrezire a cadavrelor de plante şi animale nu ar exista, am asista la epuizarea disponibilităţilor de carbon şi mai ales de azot prin înmagazinarea lor în aceste cadavre. Fenomenul de putrezire are însă loc şi el duce la descompunerea cadavrelor şi la eliberarea materiei care le constituie. Putrezirea este un proces de natură biologică şi se face prin intermediul microorganismelor. In afară de cadavre, o serie întreagă de produse organice sînt descompuse şi prefăcute în compuşi mai simpli de către microbi de îndată ce ele ajung în afara organismului animal. Microorganismele au un rol important în nutriţia plantelor, prezenţa şi natura lor condiţionînd, în mare parte, fertilitatea unui sol. Intr-adevăr, mi-

croorganismele influenţează structura fizicochimică a solului şi tot ele pregătesc hrana plantelor prin procesul de mineralizare a compuşilor organici aduşi în sol ca îngrăşăminte. În al doilea rînd, după Krasilnikov (1951), microorganismele din rizosfera plantelor secretă produşi antibiotici care, pătrunzînd în sistemul vascular al plantelor, împiedică dezvoltarea diverselor microorganisme patogene. Microorganismele din sol pot îndeplini şi funcţiuni dăunătoare plantelor. Astfel, ele pot folosi ca hrană îngrăşăminte minerale adăugate solului, transformînd aceste îngrăşăminte în produşi organici inutilizabili de către plante.

În concluzie, materia de pe planeta noastră este într-o continuă mişcare. Unele microorganisme şi mai ales plantele verzi construiesc, din substanţe anorganice sau chiar plecînd de la elemente simple, compuşi chimici foarte complecşi cum sînt proteinele, polizaharidele, lipidele. Animalele îşi sprijină cea mai mare parte din metabolismul lor pe materia organică de natură vegetală (ierbivorele) sau animală (carnivorele).

Plantele şi animalele acumulează în corpul lor cantităţi importante de azot, carbon, fosfor etc. Prin fenomenul de putrezire aceste elemente sînt redate naturii sub forma unor compuşi care pot fi din nou folosiţi şi asimilaţi de către plantele verzi şi astfel este asigurat circuitul materiei pe planeta noastră. Nici o substanţă complexă nu rămîne sub o formă fixă şi nu poate rămîne din cauză că nu este inaccesibilă acţiunii de dezintegrare a microbilor. Nimic nu rezistă acestei acţiuni. Celuloza din plante, chitina animalelor, proteinele animale sau vegetale etc., toate sînt descompuse de microbi de îndată ce ele nu se mai găsesc sub protecţia şi la adăpostul unui organism viu, de îndată ce organismul a pierdut însuşirile vieţii. Microbii la rîndul lor sînt şi ei dezintegraţi de alţi microbi. Există astfel în sol specii de actinomicete care se nutresc exclusiv pe socoteala unor bacterii, stafilococi, colibacili etc.

Să cercetăm unele din transformările pe care microbii le impun complecşilor chimici mai importanţi.

TRANSFORMAREA AZOTULUI ŞI COMPUŞILOR SĂI

Microbii au, pe de o parte, însuşirea de a constitui complecşi chimici azotaţi plecînd de la azotul atmosferic sau compuşi azotaţi simpli (amoniac, săruri de amoniu, azotaţi, aminoacizi, peptone), iar, pe de altă parte, pot desface marile molecule azotate în compuşi azotaţi simpli pînă la amoniac. Aceste două activităţi de sinteză şi dezintegrare se întîlnesc şi la alte vieţuitoare. Astfel, plantele verzi îşi constituie, în general, aminoacizii şi apoi proteinele proprii din compuşi azotaţi anorganici, cum sînt sărurile de amoniu şi nitraţii, mai puţin din nitriţi care sînt toxici şi niciodată din azotul gazos. Animalele îşi constituie proteinele din aminoacizi sintetizaţi de alte vieţuitoare; ele desfac proteinele în compuşi simpli aminoacizi, uree, acid uric etc. La microbi însă aceste două activităţi, de sinteză şi de descompunere, merg încă şi mai departe. Astfel, unii microbi pot folosi, ca singură şi exclusivă sursă de azot, azotul gazos din atmosferă, proces care nu se întîlneşte la alte vieţuitoare, iar în acţiunea lor de descompunere, ei pot duce cel mai complex produs proteic pînă la termenul final de bioxid de carbon, amoniac, apă, azot, hidrogen etc.

Scanned with OKEN Scanner

SINTEZA COMPUȘILOR AZOTAȚI DE CĂTRE MICROBI

Fixarea azotului gazos prin cuplarea sa cu hidrogenul și constituirea amoniacului este realizat de o serie de bacterii aerobe (genul *Azotobacter*) sau anaerobe *(Clostridium pasteurianum)*, precum și de unele alge. Acest proces de fixare constituie aproape singura cale prin care azotul gazos este transformat într-un compus utilizabil de către plante și anume în amoniac, și de aici importanța sa pentru agricultură. Solurile care conțin specii fixatoare de azot se îmbogățesc în compuși azotați asimilabili și, prin aceasta, devin mai fertile.

Nitrificarea. Un alt proces care se întîmplă în sol și care are importanță în agricultură este cel de nitrificare. Prin nitrificare se înțelege transformarea amoniacului în nitriți și apoi în nitrați, printr-un proces de oxidare, după ecuațiile :

$$1)\ 2\ NH_3 + 3\ O_2 = 2\ NO_2H + 2H_2O$$
$$2)\ 2\ NO_2H + O_2 = 2\ NO_3H$$

Acest proces de oxidare este realizat în sol de către bacterii și anume oxidarea amoniacului se face de către specii din genul *Nitrosomonas,* iar a nitriților în nitrați de către specii din genul *Nitrobacter.*

Complecși azotați organici. Microbii își pot sintetiza albumina proprie din cei mai variați compuși azotați. Astfel, bacteriile fixatoare de azot se dezvoltă în medii total lipsite de acest element. Aceasta înseamnă că ele, plecînd de la azotul gazos din atmosferă, sintetizează aminoacizii și apoi proteinele complexe care se găsesc în celulele bacteriei respective. Alte bacterii folosesc, ca sursă de azot, amoniacul, altele nitriții sau nitrații și în fine sînt bacterii care, ca și organismele animalelor superioare, au nevoie, pentru a-și sintetiza proteine proprii, de aminoacizi.

DESCOMPUNEREA COMPUȘILOR AZOTAȚI DE CĂTRE MICROBI

Amonificarea. Microbii pot desface cei mai complecși compuși azotați care se găsesc în natură. Proteinele animale și vegetale sînt desfăcute în cursul procesului de putrezire de către o serie întreagă de specii microbiene, în compuși din ce în ce mai simpli, pînă la termenul de amoniac, bioxid de carbon, apă etc. Descompunerea se face în două faze : faza de hidroliză a albuminei pînă la termenul de aminoacizi și faza de dezaminificare a aminoacizilor pînă la amoniac. Procesul poartă numele de *amonificare.*

Denitrificarea. Descompunerea proteinelor din cadavrele de plante și animale este utilă și înlesnește circulația materiei, apariția și dezvoltarea de noi generații de plante și animale. Unele procese de descompunere produse de bacterii sînt nedorite pentru că sînt vătămătoare. Astfel, descompunerea ureei duce la formarea a doi produși gazoși, amoniac și bioxid de carbon, care se pierd din platformele de bălegar săracindu-se, astfel, acest produs în compușii utili. La fel, prin procesul de *denitrificare,* adică de reducere a nitraților în nitriți după schema :

$$C_6H_{12}O_6 + 12\ NO_3H = 6\ CO_2 + 6\ H_2O + 12\ NO_2H$$

Scanned with OKEN Scanner

sau a nitriților în azot gazos, după ecuația :

$$C_6H_{12}O_6 + 8\ NO_2H = 6\ CO_2 + 10\ H_2O + 4\ N_2$$

se produce o acțiune vătămătoare pentru că se transformă produși utilizabili de către plante în compuși neutilizabili (nitrați sau azotul gazos).

TRANSFORMAREA CARBONULUI ȘI COMPUȘILOR SAI

Microbii sintetizează și descompun compuși hidrocarbonați. Procesele de sinteză nu au importanță practică. Amintim doar faptul că există bacterii care oxidează oxidul de carbon în bioxid de carbon adică transformă un compus toxic și inutilizabil într-un produs util în metabolismul vegetal. Nu se poate spune însă care este întinderea acestui proces în natură. Dacă procesele de sinteză nu interesează practica, cele de descompunere prezintă o importanță deosebită, în special în industrie. Numeroase procese industriale se sprijină pe activitatea fermentativă a microbilor. Pe o asemenea activitate se sprijină de exemplu, prepararea vinului și a alcoolului în general, prepararea oțetului, industria laptelui etc.

Fermentația alcoolică. O serie de microorganisme — bacterii și ciuperci — sînt capabile să descompună monozaharidele (glucoza) în alcool etilic și bioxid de carbon, după ecuația :

$$C_2H_{12}O_6 = 2\ C_2H_5OH + 2CO_2.$$

Această însușire a unor microbi este folosită în prepararea alcoolului din vin sau din alte produse. Speciile microbiene care realizează, în cele mai bune condiții, această transformare, fac parte din genul *Saccharomyces* (grupa drojdiilor sau levurilor). Specia folosită la fermentarea zahărului de struguri și fructe este *Saccharomyces ellipsoideus,* iar în prepararea berii și a piinii, specia *S. cerevisiae.* Rezultate bune se obțin atunci cînd se aleg din aceste specii variantele care corespund în cel mai înalt grad scopului urmărit.

Aceste specii de levuri sînt active față de monozaharide și mai rar și mai puțin active față de dizaharide. Pentru acest motiv este necesar ca substanțele polizaharidice (amidonul din cereale sau cartofi) înainte de a suferi fermentația alcoolică să fie hidrolizate pînă la termenul de monozaharid. Această operație se poate realiza chimic (încălzire în mediu acid) sau biologic prin intermediul fermentațiilor. În cazul preparării berii, de exemplu, hidroliza se face prin fermentul maltază, care se dezvoltă în sămînța de orz încolțită. Hidroliza se poate realiza și cu ajutorul unor specii de ciuperci din genul *Aspergillus* sau *Rhizopus.*

Fermentația acetică. Transformarea zahărului în alcool trebuie să se facă în anaerobioză, căci numai astfel se împiedică fermentația acetică, adică transformarea alcoolului în acid acetic, oțetirea vinului.

Fabricarea oțetului se sprijină tocmai pe activitatea pe care o au unele bacterii de a transforma, în aerobioză, vinul în oțet (alcoolul etilic în acid acetic).

În gospodării, pentru a realiza această prefacere, vinul este lăsat în contact cu aerul în vase deschise — în ulcioare într-un loc cald. Bacteriile

producătoare de oţet cad din aer şi oţetesc vinul. Această oţetire se poate realiza mai repede şi în condiţii mai bune cînd vinul se amestecă cu cuibar de oţet, adică cu un lichid în care deja bacteriile care au transformat vinul în oţet şi în care se găsesc deci asemenea bacterii. Fabricarea industrială a oţetului se face cu fermenţi selecţionaţi, adică cu tulpini bacteriene alese şi care produc oţetirea vinului în cele mai bune condiţii şi cu cel mai mare randament.

Fermentarea acetică este produsă de mai multe specii bacteriene, însă acelea care se folosesc cel mai frecvent fac parte din genul *Acetobacter.* Speciile din acest gen sînt aerobe. Forma celulei este alungită. Celulele se pot grupa în lanţuri, sînt mobile şi nu formează spori. Se dezvoltă pe medii obişnuite, iar cînd cresc în vin formează o peliculă mucoasă la suprafaţă.

Speciile mai importante din acest gen sînt *Acetobacter aceti* şi *Ac. pasteurianum.*

Fermentaţia butirică. În cursul unor procese fermentative, privind diverse produse alimentare (laptele şi derivatele sale, de exemplu), apare şi acidul butiric (C_3H_7COOH) care este nedorit, deoarece dă acestor alimente un gust şi miros neplăcut.

Bacteriile care realizează transformarea glucozei, a acidului lactic sau a altor substanţe în acid butiric sînt anaerobe şi fac parte din genul *Clostridium.* Specia din acest gen care produce acid butiric în mod constant şi în cantitate importantă este *Cl. butyricum.* Germenul, ca şi ceilalţi clostridieni, este un bacil sporulat şi Gram pozitiv. Creşte pe mediile obişnuite de cultură, în anaerobioză.

Fermentarea celulozei. Celuloza şi produsele înrudite, hemiceluloza, substanţele gumoase, sînt substanţe hidrocarbonate complexe (polimeri ai monozaharidelor), avînd formula brută $(C_6H_{12}O_5)n$. Ele sînt foarte răspîndite în natură. Celuloza, de exemplu, este constituentul principal al membranei celulare a plantelor.

Polizaharidele se caracterizează, printre altele, printr-o însemnată stabilitate, prin rezistenţă faţă de acţiunea dezintegrantă a substanţelor chimice şi biologice. Astfel, celuloza nu este solubilizată decît de acidul sulfuric concentrat, iar fermenţii gastrici ai ierbivorelor nu o dezintegrează, în cursul digestiei, decît parţial.

Unii microbi din grupele bacteriilor, actinomicetelor sau ciupercilor o pot desface însă pînă la termenul final de bioxid de carbon şi apă. (Vinogradski, 1938, Hungate, 1944, 1946, Pochon, 1941 şi 1949, Pochon şi Bay, 1951.) În acest fel, se dezintegrează şi se topeşte celuloza paielor sau altor furaje din grămezile de gunoi de grajd sau a resturilor de cereale, care rămîn pe cîmp după seceriş, a crengilor copacilor etc. Procesul are deci o deosebită importanţă în circulaţia materiei pe planeta noastră. El este realizat de o serie întreagă de specii microbiene. Astfel, unele bacterii anaerobe din genul *Clostridium* sau genul *Plectridium* sau aerobe din genul *Micrococcus,* unele actinomicete din genul *Actinomyces,* precum şi unele ciuperci aerobe din genul *Penicillium* pot desface celuloza în componenţi cu o structură chimică mai simplă. Aceşti germeni, aşa cum a arătat Vinogradski, pot folosi celuloza ca singura sursă de carbon. Dezintegrarea celulozei se face printr-un ferment. Specia *Bacteridium cellulosolyticum* elaborează acest ferment în mediu acid şi acesta transformă

celuloza în glucoză. Fermentarea celulozei se face mai energic în prezența nitraților.

Fermentarea celulozei de către microbi poate avea aplicații practice în alimentația ierbivorelor. S-a constatat, în acest sens, că animalele folosesc mai bine un furaj care a stat în contact cu o floră microbiană celulozolitică. Această constatare se explică prin aceea că flora celulozolitică transformă celuloza în produși asimilabili. Această transformare are loc în rumen și o dată cu ea se realizează și o multiplicare însemnată a florei celulozolitice. Trecînd din rumen în celelalte compartimente gastrice și în intestin, această floră este atacată de fermenți, dezintegrată și folosită ca aliment proteic. Intervenția acestei flore mărește deci, pe de o parte, coeficientul de digestibilitate a celulozei, iar, pe de altă parte, ea însăși constituie un aliment pentru animal.

Hidroliza grăsimilor. Grăsimile sînt răspîndite în natură fiind un constituient important al organismelor animale și vegetale și ele sînt atacate de către diverse microorganisme și transformate în produși mai simpli. Astfel, stearina, în prezența apei, poate fi desfăcută, de către microorganisme, în glicerină și acid stearic. Produșii rezultați pot fi mai departe dezintegrați și transformați în compuși încă și mai simpli. Glicerina, de exemplu, poate servi ca sursă de energie și carbon pentru o serie întreagă de bacterii patogene sau saprofite.

Este de remarcat că în absența apei procesele de hidroliză nu au loc și de aceea grăsimile lipsite de apă — untdelemnul, untura sau untul topit — nu se alterează chiar cînd nu se iau măsuri severe de asepsie. Ele, spre deosebire de alte alimente — carne, lapte — se păstrează nesterilizate și fără să li se adauge substanțe conservante.

IMPORTANȚA PRACTICĂ A FERMENTAȚIILOR MICROBIENE PENTRU DIFERITE RAMURI INDUSTRIALE

Transformarea diferitelor materii din natură, prin intermediul microbilor, prezintă o importanță deosebită. Acești microbi fac uneori transformări foarte utile și care nu se pot realiza prin alte mijloace sau se realizează în condiții mai grele și deci mai costisitoare. Pentru aceste motive, diferite ramuri ale industriei fac apel la microorganisme în vederea obținerii unor anumite transformări. Acest apel la activitatea fermentativă a microbilor nu este ceva nou, ci, dimpotrivă, foarte vechi. Lumea antică folosea și ea această activitate, dar necunoscîndu-i natura, ea nu putea să dirijeze în sensul dorit procesul fermentativ și, din această cauză, apăreau adeseori rezultate rele. Astfel, se întîmpla ca în loc ca glucoza din struguri să se transforme în vin se transforma în oțet, din cauză că se creau, în vasul de fermentare, condiții în care se dezvolta nu numai drojdia, ci și bacterii din grupul *Acetobacter*.

Știința modernă a izolat agenții diverselor transformări, a studiat condițiile în care se fac aceste transformări și ea poate astăzi dirija procesele fermentative în sensul voit. Mai mult încă, oamenii de știință fac intense cercetări în vederea obținerii celor mai utile variante de microbi transformatori ai diverselor substraturi. Astfel, se aleg variantele de *Saccharomyces ellipsoideus* care dau cea mai bună și convenabilă fermentare a glucozei

Scanned with OKEN Scanner

din struguri sau variantele de *Acetobacter* care dau cel mai bun şi plăcut oţet etc. S-a studiat, la fel, macerarea inului, izolîndu-se specii care realizează această macerare în cele mai bune condiţii, dînd un fir cît mai alb şi cît mai nepătat.

Ştiinţa fermentologiei (enzimologia) face progrese din ce în ce mai mari, punînd la dispoziţia industriei mijloace din ce în ce mai perfecţionate de prelucrare a diverselor materii.

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA a III-a

VIRUSOLOGIE GENERALĂ

Scanned with OKEN Scanner

NOȚIUNI INTRODUCTIVE

Descoperirea microscopului a permis identificarea unor vieţuitoare de dimensiuni reduse, invizibile cu ochiul liber, printre care şi agenţii unor infecţii cunoscute clinic de foarte multă vreme. Astfel au fost identificaţi agenţii antraxului, difteriei, tetanosului etc. Aceşti microbi au putut fi cultivaţi pe medii artificiale, constatîndu-se că, chiar după o lungă conservare pe asemenea medii, ei sînt capabili să producă infecţia respectivă; s-a demonstrat, astfel, în mod neîndoielnic, legătura dintre infecţie şi microbul găsit în organism, înlăturîndu-se definitiv ipoteza, răspîndită în acel timp, după care formele vizibile nu au nici un rol în infecţie, aceasta fiind provocată de principii invizibili, pe care unii cercetători i-au numit virusuri.

Perfecţionarea metodelor de cercetare a lumii microbiene a dus, în a doua jumătate a secolului al XIX-lea, la identificarea agenţilor cauzali ai multor maladii ca: tuberculoza, morva, malaria, piroplasmoza etc. şi, drumul fiind deschis, se admitea că, prin metode apropiate de cultivare şi colorare, vor fi descoperiţi, treptat, agenţii tuturor infecţiilor. Această opinie era răspîndită în lumea ştiinţifică de la sfîrşitul secolului trecut şi însuşi Pasteur, în 1889, afirma, cu privire la agentul etiologic al turbării, că acesta, deşi nu fusese văzut încă la microscop, trebuie să fie un microb. „Microbul turbării — scrie el — nu a fost încă izolat, dar, judecînd prin analogie, trebuie să credem în existenţa sa".

In 1892, Ivanovski face însă o observaţie, care infirmă ipoteza lui Pasteur după care agentul turbării ca şi agenţii altor infecţii cu etiologie necunoscută la acea dată trebuie să fie microbi asemănători celor care produc antraxul la animale sau erizipelul la om. Celebrul cercetător constată, într-adevăr, că zeama frunzelor de tutun bolnave de mozaic, trecută printr-un filtru, este încă capabilă să reproducă infecţia, deşi în filtrat nu se găseşte nici un microb vizibil la microscop sau cultivabil pe mediile de cultură folosite în bacteriologie.

Ivanovski caută să dea o explicaţie observaţiilor sale. El scrie în această privinţă (1892):

„Conform opiniilor în vigoare azi, ni se pare că infecţiozitatea filtratului frunzelor se poate explica mult mai simplu prin existenţa unei toxine secretate de bacteria prezentă în frunze şi care a trecut în seva fil-

trată [1]. Alături de aceasta, există şi o altă explicaţie posibilă şi tot atît de acceptabilă şi anume că bacteriile care produc mozaicul tutunului au pătruns prin porii filtrului Chamberland, cu toate că înainte de orice ex-

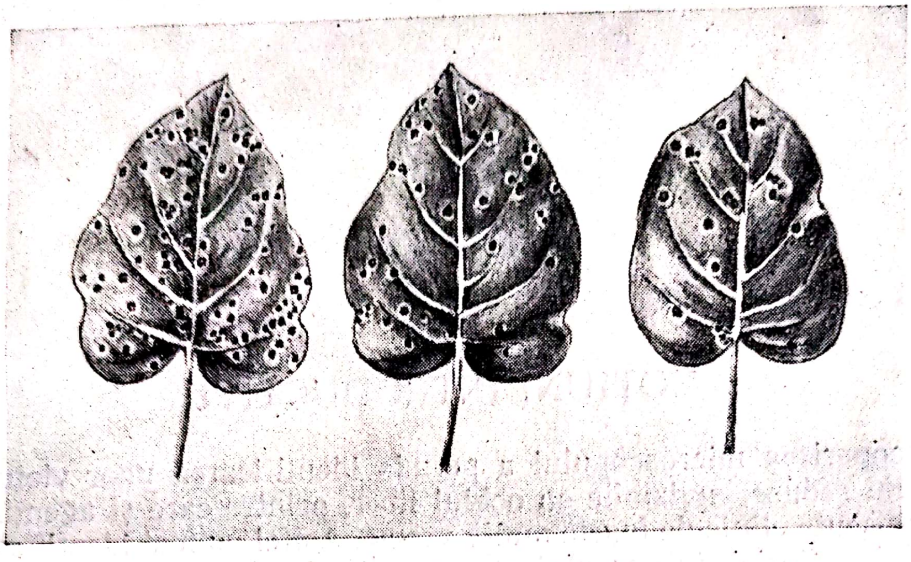


Fig. 29 — Frunze de *Nicotiana glutinosa* prezentînd leziuni produse de virusul mozaicului tutunului (după **Holmes**)

perienţă am încercat filtrul utilizat în felul obişnuit şi ne-am convins de absenţa crăpăturilor fine şi a oricăror fisuri. Am avut şi mai departe dovada perfecţiunii filtrelor folosite de mine în faptul că lichidele favorabile dezvoltării bacteriilor au rămas în întregime neschimbate timp de cîteva luni după trecerea lor prin aceste filtre". [2]

Reproducerea infecţiei în serie plecînd de la un filtrat virulent îi arată însă cercetătorului că agentul cauzal al mozaicului este un microb şi nu o toxină. Într-adevăr, tetanosul, de exemplu, poate fi şi el reprodus cu ajutorul filtrelor din culturile bacilului tetanosului, dar de la animalul astfel îmbolnăvit, intoxicaţia nu se poate transmite în serie, nu poate fi trecută la un alt animal, deoarece toxina nu se multiplică în organism. În cazul mozaicului tutunului, aşa cum a arătat pentru prima oară Ivanovski, infecţia provocată de un filtrat era transmisibilă, fapt ce dovedea că agentul se multiplică în organism şi că deci în filtrat se găsea un germen viu. Este de amintit aici că încă în 1886 savantul rus Gamaleia a reuşit să transmită pesta bovină la un viţel cu filtrat de sînge virulent, şi că el nu a dus pînă la capăt cercetările sale numai din cauză că nu avea condiţii care să împiedice difuziunea virusului în mediul ambiant.

[1] Ivanovski, aşa cum reiese din această frază, era la curent cu cercetările lui Roux şi Yersin, din 1888, prin care se demonstrase că filtratul unei culturi de bacili ai difteriei produce aceleaşi efecte morbide ca şi cultura integrală.

[2] Reprodus din „Phytopatological clasics" 1942, nr. 7, pag. 27 care a tradus în întregime memoriul publicat de Ivanovski în „Acad. Imp. Sci. Bull. nr. 35 p. 67—70, sept. 1892 şi intitulat „Über die Mosaikkrankheit der Tabakpflanzen".

Aceste cercetări făcute de Ivanovski, Gamaleia şi alţii au scos la iveală un nou grup de vieţuitoare şi anume: grupa virusurilor filtrabile.

Virusurile filtrabile iniţial nu erau vizibile şi nu erau cultivabile şi deci proba existenţei lor nu putea fi făcută decît indirect, prin constatarea efectelor acţiunii lor, adică a capacităţii lor de a îmbolnăvi un animal sau o plantă. Ele au fost la început fiinţe ale raţiunii, deoarece raţiunea le admitea existenţa, deşi simţurile umane nu luaseră contact cu ele. Astăzi simţurile umane, datorită perfecţionării tehnicii, au luat contact direct cu virusurile.

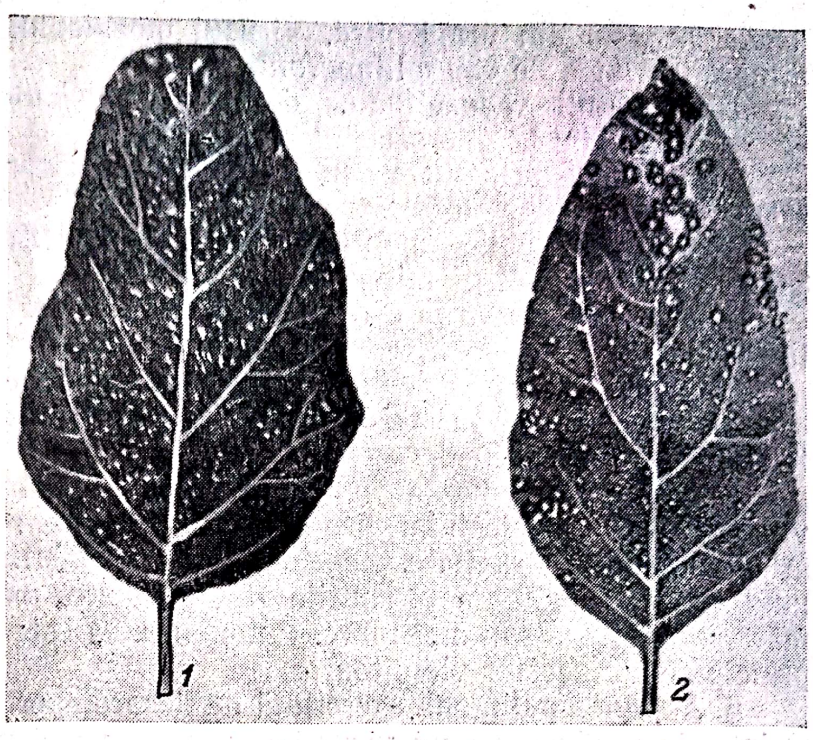


Fig. 30 — Virusul mozaicului tutunului pe frunze de *Datura stramonium* (după **Kausche**)
1 — începutul bolii; 2 — sfîrşitul bolii; se observă numeroase zone necrotice

CARACTERELE GENERALE ALE VIRUSURILOR

Studiul virusurilor a făcut asemenea progrese, în cei peste 60 de ani care ne separă de descoperirea lor, încît astăzi acest grup de vieţuitoare poate fi definit şi diferenţiat de alte grupe, prin caracterele sale morfologice şi biologice. Care sînt caracterele generale ale acestor vieţuitoare?

1. **Unitatea virus,** adică forma biologică care poate reproduce toate atributele speciei, nu este o celulă cu o structură chimică şi morfologică complexă, ci, pentru majoritatea virusurilor, ea este constituită dintr-un grup de molecule chimic identice pentru particula aceluiaşi virus.

2. **Forma particulei** poate fi rotundă, ovoidă — aşa cum sînt particulele virusurilor patogene pentru om sau animale, precum şi particulele diverselor specii de bacteriofag — sau filamentoasă — aşa cum sînt, în general, particulele virusurilor patogene pentru plante. Unele specii de bacteriofag precum şi unele specii de virus patogene pentru animale se prezintă ca nişte corpusculi rotunzi care sînt prevăzuţi cu un apendice, totul avînd o formă spermatozoidică.

3. **Dimensiunile particulelor** variază de la un virus la altul, dar aceste dimensiuni nu sînt mai mici de 10 milimicroni şi mai mari de aproximativ 300 milimicroni. Diametrul longitudinal al virusurilor filamentoase poate

depăşi această din urmă cifră. Virusul mozaicului tutunului, de exemplu, atinge lungimea de 430 milimicroni.

Dimensiunile reduse fac ca, de regulă, particulele de virus să fie:

— invizibile la microscopul cu lumină;

— filtrabile prin filtre sau membrane ai căror pori reţin bacteriile ca şi alte vieţuitoare monocelulare;

—nesedimentabile spontan sau prin centrifugare la viteze reduse, 3 000—6 000 de ture pe minut.

4. **Particula de virus** este lipsită total sau parţial de fermenţi. Această lipsă constituie, probabil, cauza pentru care virusurile:

— se multiplică în celule vii, dar niciodată pe medii inerte;

— nu se găsesc în stare saprofită şi nu manifestă nici o activitate metabolică în afara celulei receptive.

5. **Parazitismul virusurilor** în celule vii, deci în celulele unui organism viu, mono- sau pluricelular, produce tulburări mai mult sau mai puţin grave în viaţa celulei parazitate. Aceste tulburări constituie acţiunea patogenă a unui virus. Cum toate virusurile sînt parazite, toate sînt patogene într-o măsură mai mică sau mai mare. Patogenitatea este deci una din caracterele principale ale acestor vieţuitoare.

6. **Acţiunea patogenă** exercitată de fiecare specie de virus este specifică. O infecţie produsă de un virus se caracterizează prin simptome clinice şi modificări anatomice care sînt mereu aceleaşi pentru acelaşi virus şi care, în linii generale, diferă de la un virus la altul. Tipul de infecţie este, în mod practic, unul din criteriile obişnuite de diferenţiere a diverselor specii de virus.

7. **Specificitatea compoziţiei chimice.** Fiecare virus are o compoziţie chimică şi deci antigenică proprie, ceea ce face ca un virus să nu imunizeze un animal decît faţă de el însuşi. Această însuşire atrage după sine specificitatea acţiunii patogene, specificitatea reacţiilor serologice, tropismul virusurilor etc.

NOMENCLATURA VIRUSURILOR

Vieţuitoarele, avînd caracterele schiţate mai sus, au primit diverse nume ca: virusuri filtrabile, ultravirusuri, inframicrobi ca să nu amintim decît pe cele mai frecvent folosite. Fiecare din acest nume încearcă să le desemneze printr-un caracter socotit general, adică prezent la fiecare specie de virus. Or, se constată că nici unul din caracterele luate în consideraţie nu este cu adevărat general. Filtrabilitatea, de exemplu, nu este un caracter general şi exclusiv al acestor vieţuitoare, deoarece, pe de o parte, sînt specii de virus care nu au putut fi filtrate, iar, pe de altă parte, există vieţuitoare care sînt filtrabile şi nu sînt virusuri — unele specii de spirochete, rickettsii etc.

Invizibilitatea, la fel, nu caracterizează totdeauna aceste vieţuitoare. Intr-adevăr, unele din ele au putut fi văzute chiar la microscopul cu lumină şi, prin perfecţionarea mijloacelor optice, chiar cele mai mici virusuri au putut fi direct examinate.

Parazitismul obligatoriu al celulei vii este o însuşire generală a acestor vieţuitoare, dar îl întîlnim şi la alte microorganisme, protozoare, rickettsii şi, în consecinţă, nici această proprietate nu le poate singură defini.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste motive fac ca numele dat acestor microorganisme să fie cu totul convenţional. Se poate alege unul sau altul, fiecare avînd o egală valoare. Socotim însă că cel de virusuri filtrabile este cel mai potrivit, întîi pentru că este cel mai încetăţenit printre cercetători *(usus tyranus est)* şi, în al doilea rînd, pentru că este legat de o însuşire, filtrabilitatea, care a fost cea dintîi descoperită şi pe baza căreia s-au separat şi se separă încă majoritatea virusurilor de alte vieţuitoare de dimensiuni asemnătoare.

Unii cercetători, printre care şi autorii sovietici, au mers şi mai departe, folosind, pentru denumirea acestor vieţuitoare, termenul simplu de virus. Acest termen poate însă da naştere la confuzii, deoarece unii cercetători denumesc astfel toţi germenii patogeni, spunînd, de exemplu, virusul rabic ca şi virusul cărbunelui. Este recomandabil ca acest mod de folosire a cuvîntului virus să fie înlăturat şi să se întrebuinţeze denumirea simplă de virus numai pentru microorganismele care, în general, sînt filtrabile, invizibile cu microscopul cu lumină şi parazite obligatorii ale celulelor vii. Acest sens al cuvîntului virus nu este încă generalizat. În paginile ce urmează se vor folosi termenii de virus sau virus filtrabil.

Termenul de virus a fost folosit încă de mult, dîndu-i-se un înţeles asemănător celui de astăzi, ceea ce justifică şi mai mult încetăţenirea lui. Astfel, P a u l B e r t (1877) (citat în „Oeuvres de Pasteur", vol. VI, pag. 168) afirma, în opoziţie cu P a s t e u r, că antraxul nu se datoreşte bacteridei cărbunelui, ci unui principiu necultivabil şi invizibil, care însoţeşte bacteridia şi pe care el îl numeşte virus. El scrie textual: „Un virus de aceeaşi natură ca al vaccinului..."

Sensul cuvîntului „virus" a suferit, de altfel, modificări însemnate în decursul timpurilor. Astfel, latinii înţelegeau prin virus sucul unei plante sau secreţia unui animal dotate cu oarecare proprietăţi vătămătoare pentru organism, în sensul de venin. Ei numeau, de exemplu, mucozităţile care acoperă corpul melcilor „virus cochlearum", atribuindu-le, probabil, o activitate nocivă pentru om. Pînă la P a s t e u r era considerat virus orice agent morbid de origine biologică: veninul şerpilor, diversele toxine vegetale, agenţii diverselor boli infecţioase. P a s t e u r restrînge această noţiune şi el numeşte virus orice agent morbigen viu, bacterii sau virusuri. Noţiunea se restrînge şi mai mult astăzi, cînd se propune ca acest termen să numească numai un anumit grup de vieţuitoare.

IMPORTANŢA STUDIULUI VIRUSURILOR

Importanţa studierii virusurilor se datoreşte, mai cu seamă, rolului pe care ele îl au în producerea diverselor stări morbide la bacterii, plante, animale şi om. Într-adevăr, numeroase virusuri produc boli de o gravitate deosebită la plantele de cultură, animale şi oameni. Infecţii ca febra aftoasă, pesta porcină, pesta bovină, pesta aviară, la animale, sau poliomielita, febra galbenă la om, nu-şi găsesc, de exemplu, un echivalent, în ceea ce priveşte gravitatea, printre bacterioze. Mai mult încă, în timp ce numărul bacteriozelor rămîne aproape constant şi el are tendinţa de a scădea sub presiunea măsurilor sanitare, numărul virozelor creşte şi, pe măsură ce studiul unor maladii cu etiologie încă neprecizată se adînceşte, în aceeaşi măsură se descoperă noi viroze şi noi virusuri.

Scanned with OKEN Scanner

Infecţiile virotice atrag atenţia atît prin numărul lor mare, prin evoluţia lor, uneori ascunsă, prin existenţa purtătorilor de germeni greu de identificat, cît şi prin lipsa unui arsenal de prevenţie şi tratament suficient de bogat. În timp ce infecţiile bacteriene sînt combătute astăzi prin vaccinuri, seruri imune şi, în special, prin antibiotice, faţă de viroze valoarea vaccinurilor şi serurilor imune este încă redusă, iar antibiotice active nu există încă.

În aceste condiţii, studiul virusurilor filtrabile prezintă un cîmp vast de investigaţie, cercetătorii urmînd să precizeze natura unor infecţii cu etiologia necunoscută şi să găsească metode eficace de prevenire şi tratament în bolile produse de virusuri.

Scanned with OKEN Scanner

MORFOLOGIA VIRUSURILOR

Primele imagini microscopice care indicau prezența unui virus într-un țesut animal au fost obținute înainte chiar de a se cunoaște existența acestor viețuitoare. Astfel, B o l l i n g e r, în 1875, examinînd, la microscop, secțiuni făcute din leziuni cutanate de diftero-variola păsărilor, a observat pe lîngă o degenerare balonizantă a celulelor epiteliale, prezența, în aceste celule, a unor formații rotunde sau ovale de dimensiuni diferite, avînd afinitate pentru coloranți acizi și colorîndu-se, prin diverse metode, în roșu. Asemenea formații au fost găsite apoi de alți cercetători în alte infecții. S-a admis, pînă la descoperirea virusurilor filtrabile, că aceste formații, cunoscute astăzi sub numele de *incluzii celulare,* reprezentau însuși agentul morbid.

Cercetările lui I v a n o v s k i au înlăturat însă această ipoteză; din ele a reieșit că agentul patogen, în infecțiile în care se găseau incluzii, era un virus filtrabil și incluziile, dată fiind dimensiunea lor (1—30 μ) nu puteau reprezenta virusul.

Cercetătorii, în fața acestor constatări, merg mai departe, căutînd a pune în evidență însuși elementul virulent. Pe acest drum, A. B o r r e l (1903), folosind metode energice de colorare, găsește, în unele lichide sau celule virulente, formații mici, rotunde, cărora el le dă numele de *corpusculi elementari.* Aceste formații au fost puse în evidență în numeroase viroze și relațiile între ele și particula virulentă au fost, în mod neîndoielnic, stabilite.

Metoda supracolorării folosită de B o r r e l nu dădea însă rezultate pozitive în toate bolile virotice. În plus, formațiile observate nu aveau nimic caracteristic în raport cu specia de virus pe care o reprezentau. Ele aveau, în toate cazurile, aceeași formă și aceleași dimensiuni.

Aceste motive au făcut ca problema vizionării directe a virusurilor să rămînă deschisă. Un prim pas în rezolvarea ei a fost făcut prin folosirea microscopului cu lumină ultravioletă, un al doilea, poate decisiv, prin construirea microscopului electronic.

Scanned with OKEN Scanner

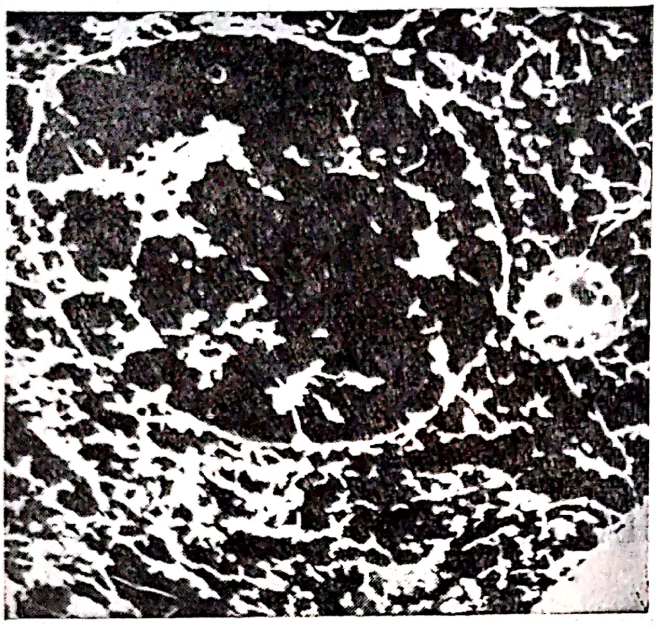


Fig. 31 — Incluzie Babeş-Negri într-o celulă nervoasă din cornul lui Amon (după **Lépine** şi **Croisant**)
Incluzia este situată în dreapta nucleului (× 9 000)

INCLUZIILE CELULARE

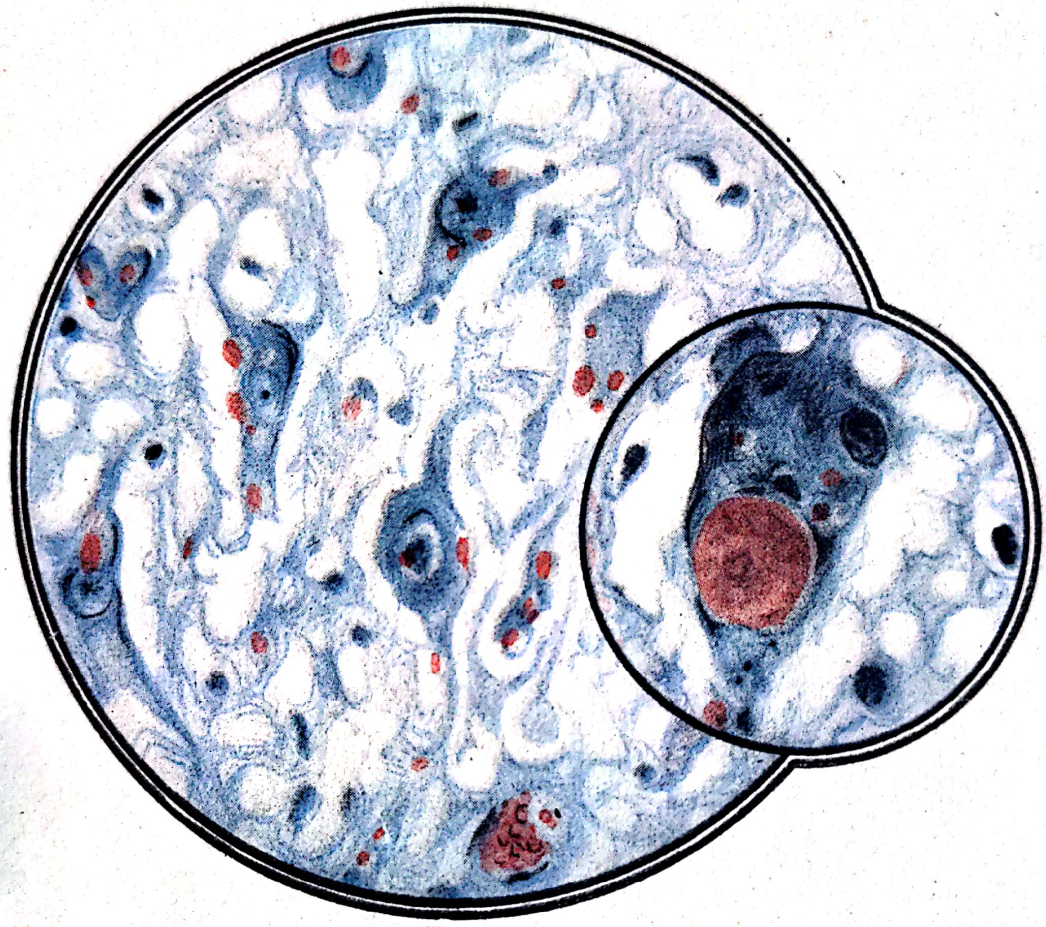
Multiplicarea virusului în celule duce la formarea, în aceste celule, a unor incluzii care prin forma lor, prin celulele în care se găsesc şi prin sediul lor în aceste celule sînt, într-o oarecare măsură, caracteristice fiecărui virus. Incluzii celulare au fost descrise în peste 30 de viroze (Nicolau, 1942). Bollinger le-a găsit, în 1873, în celule parazitate de virusul difterovariolei păsărilor, Guarnieri, în 1892, în leziunile produse de virusul variolic vaccinal, Borrel, în 1903, în leziunile în variola ovină, Babeş şi, mai tîrziu, Negri (1903) în celulele nervoase ale oamenilor şi animalelor moarte de turbare, Joest şi Degen, în 1911, în celulele parazitate de virusul bolii de Borna etc. Aceste diverse incluzii sînt cunoscute şi sub numele cercetătorului care le-a pus în evidenţă, pentru prima oară — incluziile lui Bollinger, Guarnieri, Borrel, Babeş-Negri, Joest şi Degen etc.

Incluziile se găsesc în celulele în care virusul se înmulţeşte, deci în celulele pentru care virusul are afinitate; incluziile variolice se găsesc în celulele pielii, cele rabice în celulele nervoase etc. In celulă ele pot fi situate exclusiv în citoplasmă sau exclusiv în nucleu sau şi în nucleu şi în citoplasmă. Astfel, în infecţia rabică ele sînt situate exclusiv în citoplasmă, iar în maladia de Borna, varicela umană, pesta porcină, hepatita epidemică umană, pesta aviară experimentală a şoarecelui, numai în nucleu, în paravaccin, în herpes, în citoplasmă şi în nucleu.

Incluzia se prezintă ca o masă oxifilă, de regulă, omogenă. Ea ocupă, uneori, o mare parte din celulă şi este înconjurată de o zonă clară, care se numeşte halo. Unele incluzii au o membrană şi o structură. Ele dau, după Turevici, 1949, reacţia Feulgen pozitivă. Forma

Fig. 32 — Amănunte de structură ale unei incluzii Bollinger (diftero-variola aviară) (după **Lepiné** şi **Croisant**)
Se observă numeroşi corpusculi elementari

PLANȘA V



Incluzii Babeș-Negri

Frotiu din creier de cîine mort de turbare

Scanned with OKEN Scanner

lor este, în general, rotundă. Dimensiunile lor variază de la un virus la altul şi, chiar pentru acelaşi virus, de la o celulă la alta şi chiar în aceeaşi celulă putem găsi incluzii de diverse mărimi, aşa cum se întîmplă, de exemplu, în turbare. Diametrul incluziilor este cuprins între 1 şi 30 μ. Se co-

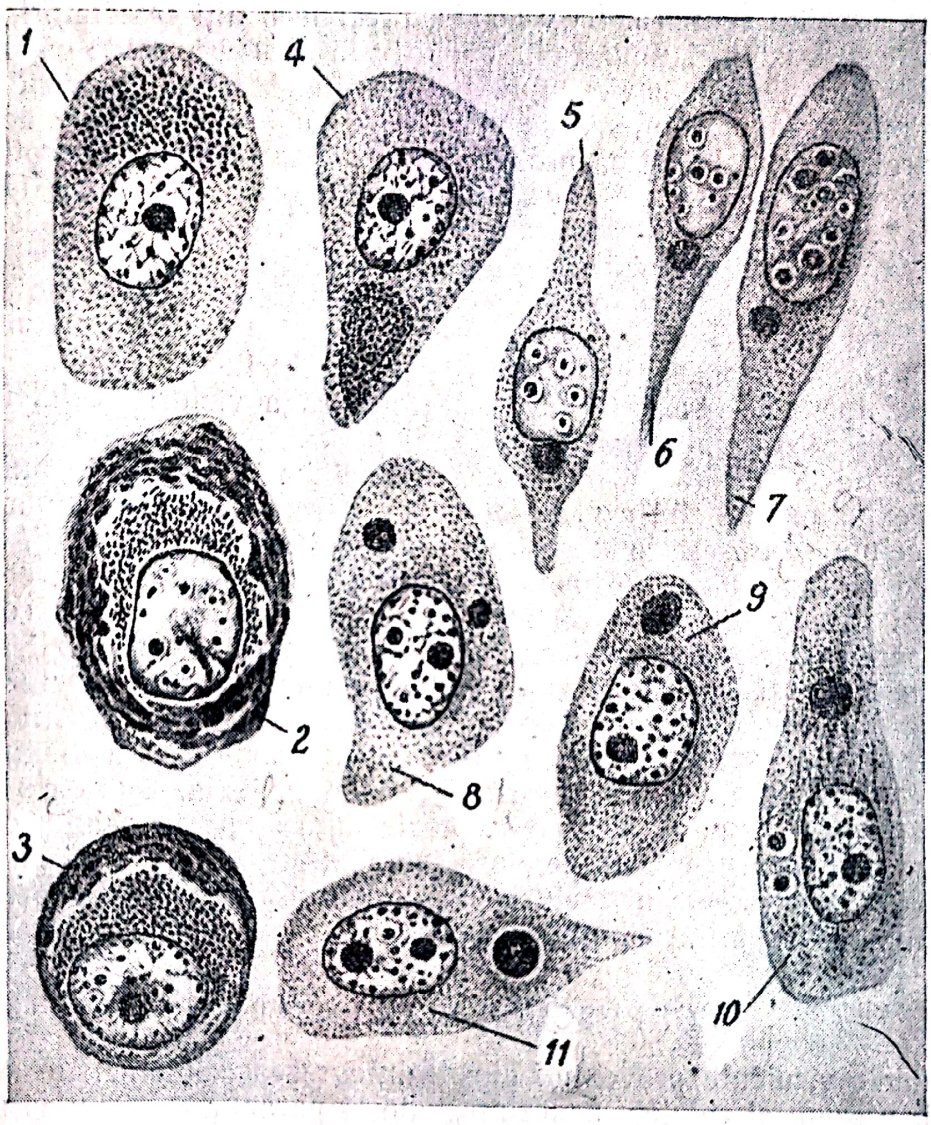


Fig. 33 — Morfogeneza incluziilor virotice la virusul herpesului (după Nicolau Şt.) Corpusculii elementari din 1 sînt concentraţi în incluzie în 11. Trecerea de la corpusculii elementari la incluzia virotică se face printr-o serie de faze intermediare care se văd în 2,3,4,5, etc.

lorează diferit de elementele normale ale celulei şi pentru punerea lor în evidenţă se folosesc metode speciale de colorare.

Relaţiile dintre incluziile celulare şi virus sînt incontestabile. O celulă nu conţine adevărate incluzii decît atunci cînd ea a fost parazitată de virus, de unde importanţa lor în diagnosticul virozelor. Faptul că, în general, virusurile filtrabile şi numai ele produc incluzii celulare trebuie socotit ca o caracteristică care apropie virusurile între ele şi le distinge de alţi microbi paraziţi. Formarea incluziilor dovedeşte unitatea lumii ultravirusurilor. Ce legături există între virus şi incluzie? Este incluzia virusul

însuşi ? Este incluzia leziunea pe care virusul a provocat-o celulei sau un produs de reacţie sau este şi una şi alta ?

Unii cercetători le-au considerat protozoare, deci însuşi elementul patogen şi le-au numit Chlamidozoare pentru că se recunoaşte, în jurul lor, un înveliş, o hlamidă. Alţi cercetători le-au considerat ciuperci sau produse de degenerescenţă celulară. Levaditi, precum şi alţi cercetători, plecînd de la ipoteza existenţei unui ciclu evolutiv la virusuri, crede că incluziile reprezintă faza vizibilă a virusului. Babeş a socotit că incluziile reprezintă aglomerarea particulelor de virus care au fost inactivate de forţele de apărare ale celulei. Tot ca produse de degenerare au fost socotite şi de către Marinescu şi Stroescu. În fine, Şt. Nicolau (1937) le consideră „agregate de inframicrobi intracelulari, degeneraţi şi sudaţi în blocuri compacte sub influenţa acţiunii de apărare a celulei". Incluziile se găsesc, într-adevăr, uneori în celulele care şi-au păstrat afinităţile tinctoriale şi aspectul morfologic normal, ceea ce ar corespunde şi unei fiziologii normale. Aceste observaţii ar dovedi că incluziile reprezintă, aşa cum se exprimă tot Nicolau, expresia morfologică a victoriei celulei faţă de inframicrobii ce o invadaseră.

Urmărind condiţiile de formare a incluziilor în ţesuturile animalelor infectate experimental, Nicolau constată, într-adevăr, că în prima fază a bolii, în celulă se găsesc numeroşi corpusculi elementari virulenţi, care, pe măsură ce ne îndepărtăm de momentul infecţiei, se aglutinează, constituie grămezi şi în cele din urmă un bloc rotund cu afinităţi pentru coloranţii acizi şi care nu este altceva decît incluzia celulară. La concluzii similare ajunge în 1951 şi Stroescu, care a studiat evoluţia incluziilor în diftero-variola aviară. Autorul, folosind metoda impregnării argentice, arată că, iniţial, în celulă există numai corpusculi elementari. Aceştia se multiplică, constituie germeni în formă de rozetă şi apoi incluzia. Stroescu mai afirmă că virusul se multiplică pe socoteala mitocondriilor celulare.

Substanţele care constituie, aşa cum a constatat Michaelis, Turevici şi alţii, blocul incluziei sînt de natură lipidică şi proteinică. Lipidele nu sînt uniform răspîndite, ci constituie mase asimetrice în incluzie.

CORPUSCULII ELEMENTARI

Lichidele virulente provenind din dezintegrarea celulelor sub acţiunea virusului, precum şi celulele nedezintegrate şi parazitate de un virus conţin, aşa cum numeroşi cercetători au arătat, elemente corpusculare rotunde, izolate sau grupate în lanţuri scurte sau în grămezi neregulate. Aceste elemente au dimensiuni care variază de la 0,2 la 0,5 μ şi au fost numite corpusculi elementari. Asemenea formaţii au fost identificate în numeroase viroze ca diftero-variola aviară, variola ovină, variola vaccin, ectromelia etc. În general, corpusculii elementari s-au găsit, în mod constant, la toate virusurile de dimensiuni mari — peste 200 milimicroni — dar mai puţin constant la virusurile mai mari de 60—90 milimicroni şi mai mici de 200 milimicroni. Virusurile sub 60 milimicroni, cu excepţia virusurilor febrei aftoase, nu prezintă corpusculi elementari. Corpusculii elementari au fost cercetaţi îndeaproape de Borrel şi, pentru acest motiv, s-a propus ca să fie numiţi după numele acestui cercetător, şi anume *Borreliota,* iar infecţiile respective borreliotoze. Corpusculii diferitelor viroze au primit, în urma acestei propuneri, o nomenclatură bi- sau trinominală. Astfel, cor-

pusculii din variola aviară au fost numiți *Borreliota avium*, cei din variola ovină *Borreliota variolae ovium*. Ei mai sînt cunoscuți în literatură și cu numele autorului care i-a descris pentru prima oară. Corpusculii lui Borrel pentru elementele corpusculare găsite în leziunile de diftero-variolă aviară, corpusculii lui Paschen pentru cei găsiți în leziunile de variolă vaccin etc.

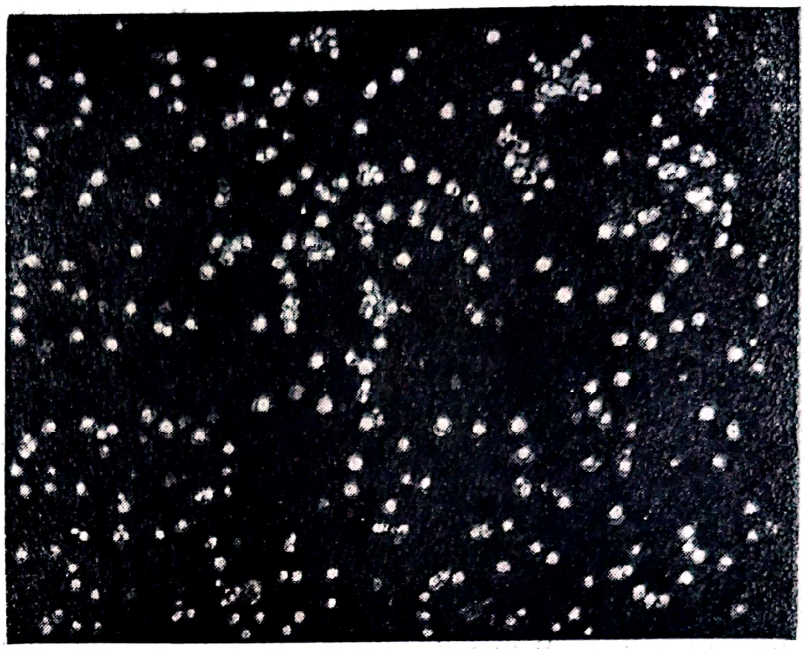


Fig. 34 — Corpusculi elementari ai virusului vaccinal (după **Amies**).
Izolarea prin ultracentrifugare diferențială

Corpusculii elementari nu pot fi, după unii autori, însăși unitatea virulentă; dimensiunile lor sînt prea mari în raport cu cele ale particulei virulente. Ele sînt considerate, de acești autori, agregate de elemente virulente, înglobate în materie străină pe care au împrumutat-o din mediul în care s-au dezvoltat sau din soluția colorantă cu care au fost în contact.

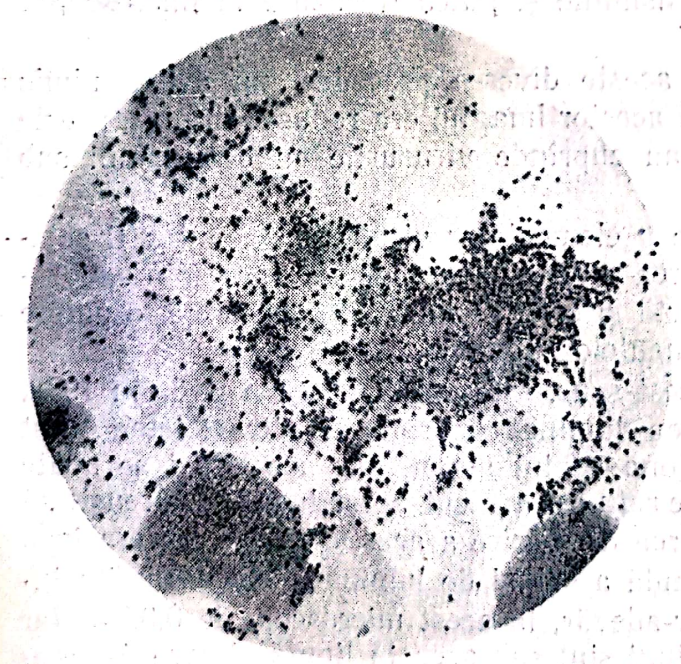


Fig. 35 — Corpusculi elementari ai virusului vaccinal din culturi în plasmă și țesut testicular (după **Doerr și Hallauer**)
Colorația după Paschen

Legăturile acestor elemente cu materie virulentă au fost pe deplin demonstrate. Numeroși cercetători au dovedit, în acest sens, că corpusculii elementari, izolați cu ajutorul micromanipulatorului, sînt capabili să producă infecție. În același sens, s-a arătat că suspensiile de corpusculi sînt aglutinante, în mod specific, de un ser imun. C. Levaditi (1943) afirmă însă că nu toate elementele corpusculare care se obțin dintr-un material virulent, în special din pulpa vaccinală, reprezintă unități virulente; alături de corpusculii virulenți mai sînt molecule de aceeași formă, care însă nu au nici o legătură cu virusul. Ele pot fi mase proteice, detritusuri celulare etc.

Scanned with OKEN Scanner

Corpusculii elementari au putut fi analizaţi şi din punct de vedere chimic; această analiză a arătat că ei se compun, în mare parte, 83,12% din materia proteică. Ei se colorează prin metode speciale.

IMAGINI OBŢINUTE PRINTR-O ALTĂ OPTICĂ DECÎT CEA CU LUMINĂ

Metodele aplicate în bacteriologie, pentru a examina forma celulelor, nu puteau da rezultate în cercetarea virusurilor filtrabile, deoarece acestea din urmă au dimensiuni situate sub limita de vizibilitate a microscopului cu lumină. Într-adevăr, microscopul cu lumină nu poate pune în evidenţă particule mai mici ca lungimea de undă pe care o poate folosi şi de care este luminat, şi anume mai mici de 0,2 μ.

Radiaţiile cu o lungime mai mică de undă, sub 0,2 μ, care ar putea pune în evidenţă asemenea particule, nu pot fi folosite de microscopul obişnuit, printre altele, pentru motivul că nu impresionează ochiul uman. Totuşi, unele virusuri de dimensiuni mai mari au putut fi văzute cu acest microscop prin anumite artificii experimentale. Astfel, examenul între lamă şi lamelă a unei suspensii de particule virulente a permis, mai ales în cîmp întunecat, vizionarea unor particule rotunde, ovale. Imagini mai clare se obţineau colorînd particulele în suspensie cu o soluţie 1% de roşu neutru sau de altă soluţie colorantă potrivită. Prin procedeele de supracolorare, au putut fi puşi în evidenţă corpusculii elementari în diverse lichide virulente. Particula virulentă se încărca cu colorant în cursul supracolorării, îşi mărea, astfel, dimensiunile şi putea fi văzută la microscopul cu lumină.

Elementele vizionate, prin aceste diverse procedee, nu aveau nimic caracteristic şi de aceea valoarea acestor imagini era redusă. În plus, aceste metode de investigaţie nu puteau cuprinde virusurile cu dimensiuni sub 0,1 μ.

Problema examinării directe a elementelor virulente nu putea fi complet rezolvată decît prin utilizarea unor aparate optice care foloseau radiaţii cu o lungime de undă scurtă şi care să aibă, în consecinţă, o putere de rezoluţie, de separare a elementelor figurate, foarte mare.

O soluţie a problemei, în acest sens, este dată de B e r n a r d, în 1932, care întrebuinţează un microscop luminat cu radiaţii ultraviolete. Acest fel de lumină nu poate impresiona ochiul uman, dar acestuia i se poate substitui o placă fotografică. B e r n a r d a făcut acest lucru şi a reuşit să fotografieze unele virusuri. Puterea de mărire a acestui microscop era însă şi ea limitată de lungimea de undă a sursei de lumină folosită. Limita inferioară de vizibilitate este într-adevăr, la acest microscop, de 0,05μ, dar există virusuri ale căror dimensiuni sînt sub această limită şi care, în consecinţă, nu pot fi văzute. Problema vizionării particulelor de dimensiuni foarte mici nu a fost complet rezolvată prin construirea acestui aparat şi ea rămînea deschisă.

Scanned with OKEN Scanner

IMAGINEA VIRUSURILOR LA MICROSCOPUL CU LUMINĂ ULTRAVIOLETĂ

Utilizarea radiaţiilor ultraviolete se face la microscop cu lentile de cuarţ, din cauză că cele de sticlă nu sînt traversate de acest fel de radiaţii. Punerea la punct este foarte greoaie, dar s-a reuşit totuşi să se obţină, pe plăci fotografice, imaginea unor particule virulente, ca cele aparţinînd virusului variolic vaccinal sau virusului ectromeliei. Elementele fotografiate sînt de formă mai mult sau mai puţin sferică. Unele sînt uşor alungite, avînd forma unui coc înainte de diviziune. Ele pot fi izolate sau grupate cîte două sau mai multe, constituind grămezi neregulate. Imaginile au fost măsurate şi, ţinînd seama de puterea de mărire a microscopului, s-au putut determina dimensiunile pe care le au diversele particule.

IMAGINEA PARTICULELOR DE VIRUS ÎN LUMINESCENŢĂ

Imaginile date de lumina ultravioletă şi care au putut fi fotografiate, dar nu vizionate de ochiul uman, pot fi făcute vizibile printr-un artificiu de tehnică. Artificiul folosit este o aplicaţie a legii fizice, după care o radiaţie de lungime de undă dată emite radiaţii cu o lungime de undă mai mare atunci cînd întîlneşte un corp fluorescent. În consecinţă, radiaţiile ultraviolete dacă vor întîlni particule de virus impregnate cu o substanţă fluorescentă, le vor face să emită radiaţii mai lungi ca cele ultraviolete şi care, situîndu-se în spectrul vizibil ochiului uman — spectrul vizibil este situat între lungimile de undă de 0,2—0,8 μ — vor putea fi vizionate direct. Pentru realizarea acestui principiu teoretic, era întîi necesară construcţia unui aparat care să permită proiecţia imaginii date de microscopul adaptat luminii ultraviolete într-un microscop obişnuit şi apoi colorarea particulelor virulente cu o substanţă fluorescentă. Aparatul necesar a fost conceput şi fabricat, după indicaţiile lui Hagemann (1937), iar metode de colorare potrivite au fost puse la punct întîi de Hagemann şi apoi perfecţionate (1939) de C. Levaditi.

Iată tehnica de colorare folosită :

1. suspensia virulentă se pune în strat subţire pe o lamă curată ;
2. lama se ţine pentru uscare 1 oră la 37°C ;
3. apoi se spală 10 minute în apă distilată ;
4. se usucă 1 oră la 37°C ;
5. se colorează 5 minute într-o soluţie de 0,2% de thioflavină S, trecută prin filtrul Chamberland L_2 ;
6. se spală cu apă distilată şi apoi se usucă 30 de minute la 37°C.

Pe frotiul astfel tratat şi examinat la microscopul cu luminiscenţă, elementele corpusculare apar colorate în albastru-luminos, fondul frotiului fiind întunecat.

Levaditi (1939) recomandă un procedeu care permite impregnarea vitală a elementelor cu substanţă fluorescentă, examinarea lor între lamă şi

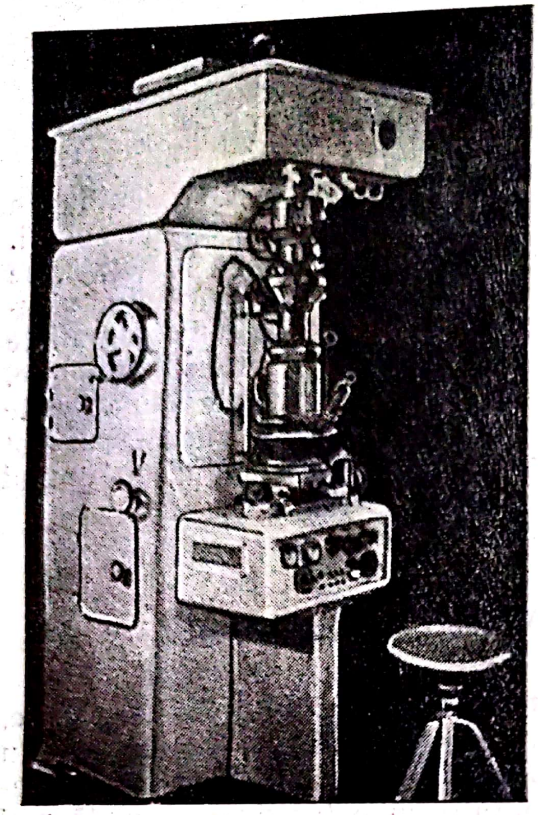


Fig. 36 — Microscopul electronic

lamelă şi eventual numărarea lor. Pentru a realiza această impregnare vitală se procedează astfel:

1. suspensia virulentă, în soluţie tampon la pH = 7,2, se introduce, în volum de 0,5 ml într-un tub de reacţie;

2. peste suspensie se adaugă o picătură din soluţia de thioflavină — aceeaşi diluţie ca mai sus;

3. totul se amestecă cu o pipetă de sticlă şi apoi se examinează între lamă şi lamelă.

Elementele corpusculare prezintă, în aceste din urmă condiţii, mişcări pe loc, sînt colorate în albastru-luminos, cîmpul microscopic fiind albastru-închis şi uşor fluorescent. Folosind această tehnică, Levaditi, Stamatin, Le-Van-Sèn şi Renié (1939) au putut preciza numărul de corpusculi elementari, din virusul vaccinal, care este capabil să producă infecţia la iepuri. Ei au dovedit, în acest sens, că niciodată un singur corpuscul elementar nu poate să producă o leziune cutanată la iepure.

MICROSCOPUL ELECTRONIC

Mecanica ondulatorie identifică lumina cu materia. În consecinţă, electronii, particule de electricitate negativă, trebuie să aibă în mişcarea lor aceleaşi proprietăţi ca şi radiaţiile luminoase. Radiaţiile electronice, spre deosebire de cele luminoase, au însă o lungime de undă foarte scurtă şi de aceea ele pot fi folosite pentru a pune în evidenţă particule materiale foarte mici. Intr-adevăr, puterea de separare şi deci de mărire a unui microscop este în funcţie de lungimea de undă a luminii folosite.

Experienţa a confirmat aceste previziuni teoretice şi pe baza lor, după numeroase încercări, s-a construit microscopul electronic. Construcţia acestuia s-a făcut după modelul microscoapelor cu lumină, cu adaptările tehnice necesare. Sursa de lumină, pentru microscopul electronic, este constituită de un emiţător de electroni; lentilele de sticlă ale microscopului cu lumină sînt înlocuite, la microscopul electronic, cu bobine electrice sau magnetice.

Emisiunea de electroni pleacă de la un catod spre un anod. Între catod şi anod este necesară o diferenţă importantă de potenţial — 40 pînă la 220 Kw (se folosesc de obicei electronii de 40—100 Kw) — căci numai în aceste condiţii electronii au viteza necesară scopului urmărit.

Electronii, emişi de catod, se împrăştie în toate direcţiile. Pentru a

putea fi folosiţi, ei trebuie concentraţi asupra obiectului şi această concentrare se realizează printr-un cîmp magnetic care are, la microscopul electronic, funcţiile lentilei condensator de la microscopul cu lumină. Radiaţiile electronice, în drumul lor întîlnesc obiectul — preparatul de examinat — pe care îl traversează. Radiaţiile, traversînd preparatul, suferă procese de difracţie variabile în raport cu densitatea masei întîlnite. Este necesar ca ele să fie din nou concentrate, ceea ce se realizează printr-o nouă lentilă electrică, numită lentilă obiectiv. Se formează o primă imagine a obiectului, numită imagine intermediară. Radiaţiile însă îşi continuă drumul, întîlnesc un nou cîmp magnetic creat de a treia lentilă electrică, lentila ocularelor de la microscopul cu lumină, care le concentrează şi le proiectează dînd imaginea finală. Aceasta poate fi observată pe un ecran luminos sau, înlocuind ecranul cu o placă sensibilă, poate fi fotografiată.

Sursa de electroni, bobinele electrice şi materialul de examinat se găsesc toate într-un tub compus din cinci segmente demontabile, însă care se cuplează ermetic constituind un tub perfect închis din care aerul, în momentul funcţionării, se scoate cu pompa de vid. Presiunea aerului în tub trebuie să fie extrem de redusă — 0,0001 mm Hg — căci aerul produce difracţia radiaţiilor, deoarece ele au o foarte redusă putere de pătrundere.

Microscopul trebuie să dispună de un izvor electric foarte puternic care trebuie să încălzească catodul emiţător de electroni, să alimenteze bobinele-lentile şi să pună în funcţiune pompele de vid.

PREPARAREA MATERIALULUI

Prepararea materialului, în vederea examinării sale cu op-

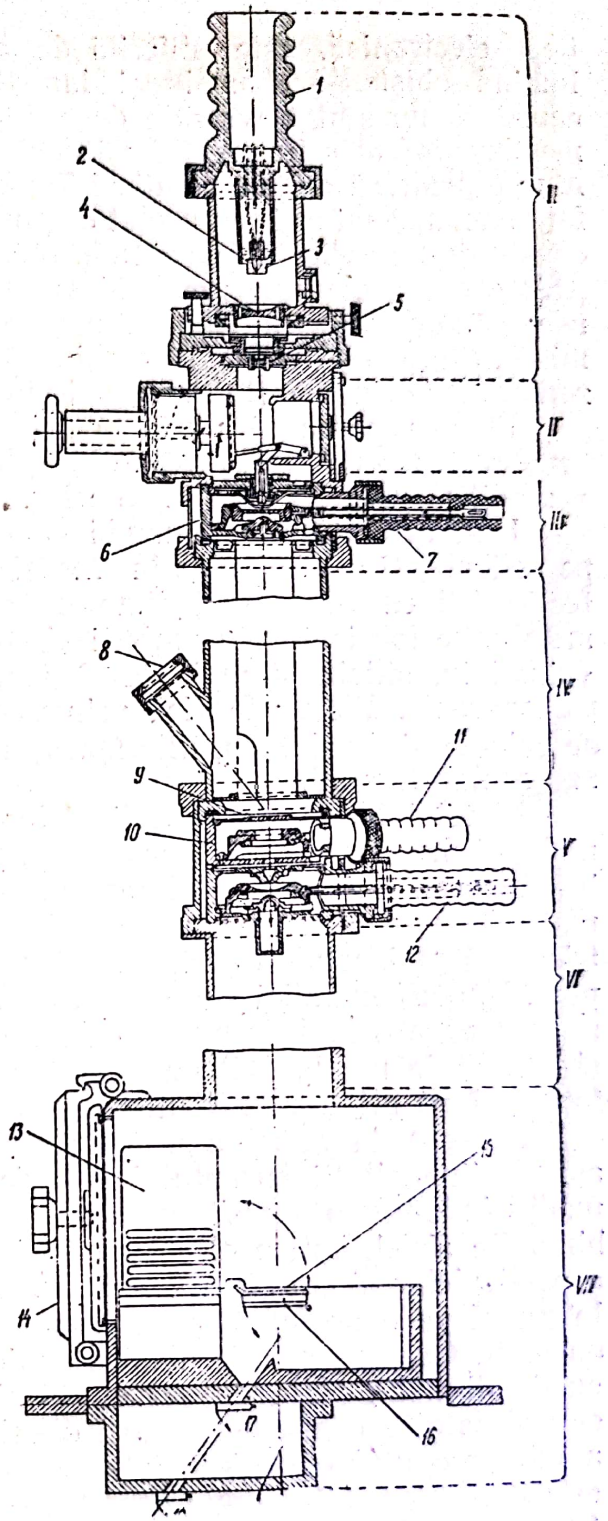


Fig. 37 — Schema microscopului electronic *I* — sursa electronică (dispozitivul de iluminare): 1 — izolator catodic; 2 — catod; 3 — electrod de focalizare; 4 — anod; 5 — diafragmă; *II* — camera obiectivului; *III* — lentila obiectiv (6) şi izolatorul (7); *IV* — tub obiectiv: 8 — fereastră pentru observarea imaginii intermediare; 9 — ecran pentru imaginea intermediară; *V* — lentilă de protecţie: 10 — lentilă cu distanţă focală mică; 11 şi 12 izolatori; *VI* — tub de proiecţie; *VII* — cameră fotografică: 13 — magazia pentru plăci fotografice; 14 — uşa camerei fotografice; 15 — ecranul imaginii finale; 16 — placa fotografică; 17 şi 18 — uşile ecluzei; 19 — spaţiul ecluzei

Scanned with OKEN Scanner

tica electronică, este diferită de acea folosită pentru examinarea în lumină obişnuită. Lamele şi lamelele de sticlă nu pot fi folosite din cauză că nu sînt traversate de radiaţiile electronice. Ele sînt înlocuite cu membrane foarte fine — 10 milimicroni — de colodiu care se prepară punînd o picătură dintr-o soluţie 1,5% de colodiu în acetat de amil, pe suprafaţa unei ape saturate cu acetat de amil. Picătura, astfel adăugată, se întinde constituind o peliculă foarte fină. Membrana se fixează pe discul portobiect. Acesta din urmă este prevăzut cu o deschizătură în dreptul căreia, după uscarea membranei în vid, se pune o picătură din suspensia virusului de examinat. Suspensia trebuie să conţină numai particule virulente, deoarece prezenţa altor elemente figurate poate îngreuia interpretarea preparatului.

După uscarea picăturii cu suspensie de virus, portobiectul este pus într-un dispozitiv care permite introducerea lui în tubul microscopului, fără a modifica prea mult vidul interior.

Unii cercetători recomandă ca materialul de examinat să nu fie pus pe peliculă, ci să fie inclus în însăşi pelicula de colodiu în momentul confecţionării ei. În ultimul timp, membranele de colodiu sînt înlocuite cu membrane fabricate din materii sintetice sau chiar cu membrane metalice (aluminiu, siliciu şi mai ales beriliu), care sînt foarte subţiri şi foarte transparente. Ele se fabrică prin vaporizarea metalului pe o membrană de colodiu şi dizolvarea, ulterioară, a membranei de colodiu, în alcool-eter sau acetat de amil.

Imagini în relief ale particulelor se obţin prin metoda metalizării sau umbririi preparatelor. În acest scop, membrana pe care s-a etalat materialul de examinat este pusă într-un recipient din care aerul se scoate cît mai mult posibil. În recipient se face, pe un fir de tungsten, încălzit electric pînă la incandescenţă, vaporizarea unui metal greu (aurul, de exemplu). Vaporii metalici se depun numai pe o faţă a particulelor, deoarece membrana are faţă de punctul de vaporizare o anumită înclinare (5—12°) şi constituie un depozit opac. Acest depozit face ca în imaginile care se fotografiază ulterior particulele să fie bine vizibile şi mult reliefate.

Punerea la punct a preparatului se face acţionînd printr-un reostat asupra intensităţii curentului electric din bobina obiectiv, punctul focal modificîndu-se în raport cu intensitatea curentului care traversează bobina. De altfel, optica electronică permite vizionarea, cu aceeaşi claritate, a particulelor situate în planuri diferite. Elementele sînt puse, într-adevăr, la punct pe o profunzime de o mie de ori mai mare ca a microscopului obişnuit. Cu alte cuvinte, dacă cu microscopul de lumină examinăm particulele dintr-un plan, cu cel electronic le examinăm, în acelaşi timp, pe cele situate în o mie de planuri diferite şi paralele. Această particularitate a microscopului electronic înlesneşte foarte mult punerea la punct şi ea este datorită micii deschideri a lentilei obiectiv. Într-adevăr, lentilele electrice sau magnetice au, în raport cu cele folosite de microscopul cu lumină, o deschidere foarte mică — 0,001 mm faţă de 1 sau 1,5 mm. La o asemenea deschidere şi cu o lungime de undă de 0,1 milimicroni, puterea teoretică de separare a microscopului electronic este de 2,5 milimicroni, ceea ce permite vizionarea unor particule mult mai mici ca cele perceptibile cu microscopul cu lumină. Astfel, dacă acesta din urmă măreşte o particulă de aproximativ 2 000 de ori, microscopul electronic o poate teoretic mări de 100 000 şi chiar 200 000 de ori. Practic, pînă în prezent nu s-au putut

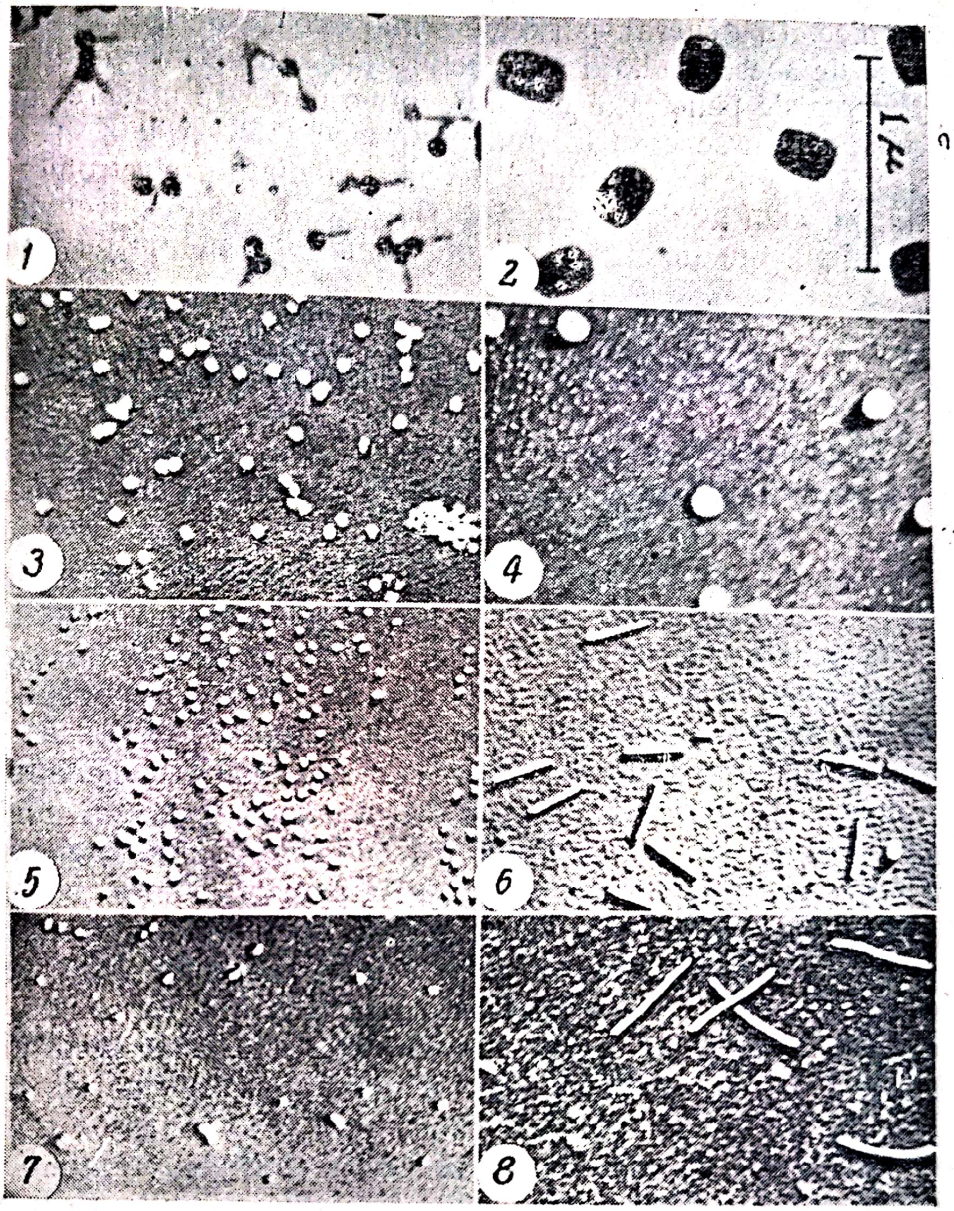


Fig. 38 — Imaginile electronice ale cîtorva virusuri (după **Knight**)
1 — virusul bacteriofag; 2 — virusul vaccinal; 3 — virusul papilonului lui Shope; 4 — virusul gripei umane; 5 — virusul mozaicului tutunului; 7 — virusul Bushy Stunt; 8 — virusul X (mozaicul latent al cartofului)

însă obţine imagini mărite mai mult de 40 000—80 000 de ori şi nu s-au putut viziona particule mai mici de 2 milimicroni. Particulele, avînd 5—500 milimicroni, pot fi, în modalităţile actuale de lucru, examinate în condiţii optime.

Imaginea electronică ne indică modul de repartizare a maselor în cîmpul traversat de radiaţiile electronice. Acestea sînt cu atît mai slăbite, în intensitatea lor, cu cît masa întîlnită este mai mare. Slăbirea intensităţii radiaţiilor se traduce în imagine printr-o zonă întunecată. Bacteriile sau particulele de virus îşi proiectează umbra lor pe ecranul luminos sau pe placa fotografică. Acestea apar net, în raport cu cîmpul din jur, unde, nefiind particule, deci mase, radiaţiile au fost mai puţin slăbite în cursul traversării şi ele luminează puternic cîmpul. Conturul imaginilor este clar şi net delimitat. Aceste caractere permit măsurarea imaginilor şi deci determinarea dimensiunilor particulelor pe care ele le reprezintă.

Structura internă a particulelor nu poate fi examinată decît la particulele care au diametrul mic şi deci pot fi traversate de radiaţiile elec-

tronice. In general, particulele mai groase de 0,5 microni nu sînt traversate de aceste radiaţii şi structura lor internă nu poate fi pusă în evidenţă. Puterea de penetraţie poate fi, într-o oarecare măsură, mărită, prin folosirea unei surse electrice mai puternice (150—200 Kw).

Traversarea obiectului de către radiaţiile electronice încălzeşte obiectul, putîndu-l chiar carboniza. Se evită acest inconvenient răcind aparatul în timpul funcţionării şi lucrînd cît mai repede cu putinţă.

DETERMINAREA DIMENSIUNILOR VIRUSURILOR

DETERMINAREA DIMENSIUNILOR, FORMEI ŞI STRUCTURII VIRUSURILOR CU AJUTORUL MICROSCOPULUI ELECTRONIC

Microscopul electronic a permis examinarea formei la o serie întreagă de virusuri patogene pentru animale, plante sau bacterii. Virusurile patogene pentru om sau animale au, în general, o formă ovoidă sau sferică. Elementele virusului vaccinal şi altor virusuri patogene pentru animale au, în fotografiile electronice, o formă poliedrică, care ar fi datorită modului de grupare a moleculelor constituente. Bacteriofagii au o formă corpusculară, prevăzută cu o prelungire avînd aspectul unui apendice. Virusurile patogene pentru plante sînt, de regulă, alungite, avînd o formă filamentoasă sau de bastonaş asemănătoare cu a unor bacterii. Forma alungită ar fi datorită dispoziţiei liniare a moleculelor care compun particula virulentă. Particulele de virus, după imaginile obţinute cu microscopul electronic, sînt lipsite de membrana externă. Virusurile, în special cele de dimensiuni mai mari, nu prezintă totuşi în imaginile electronice un aspect omogen, ci heterogen, ceea ce dovedeşte că ele nu sînt mase moleculare de acelaşi fel.

Imaginile particulelor virulente obţinute cu ajutorul microscopului electronic pot servi pentru a preciza dimensiunile elementelor pe care le reprezintă. In acest scop, se măsoară lungimea şi lăţimea imaginii de pe clişeu şi fiecare dimensiune, astfel obţinută, se împarte cu cifra care reprezintă numărul de cîte ori a fost mărită particula.

Iată cifrele obţinute, prin acest procedeu, pentru virusul vaccinal:

— lungimea medie pentru mai multe particule fotografiate, 6,7 mm;

— lăţimea medie pentru mai multe particule fotografiate, 5,3 mm.

Impărţind aceste cifre cu 23 000 (grossismentul microscopului), se obţin cifrele de 290 milimicroni pentru lungime şi 230 milimicroni pentru lăţime.

Prin calcul sau cîntărind suprafaţa de hîrtie care reprezintă imaginea virusului (se taie de pe hîrtia fotografică această imagine cu foarfecele) se poate determina şi suprafaţa particulei de virus. Se compară, în acest scop, greutatea medie a suprafeţei mai multor particule, cu greutatea unui centimetru pătrat din aceeaşi hîrtie fotografică, calculîndu-se apoi, printr-o regulă de trei simplă, suprafaţa medie a particulei.

Scanned with OKEN Scanner

DETERMINAREA DIMENSIUNILOR PARTICULELOR DE VIRUS PRIN ULTRAFILTRARE

Se folosesc în acest scop ultrafiltre de diverse porozităţi. Dimensiunile porilor se determină pe o parte din discurile provenind dintr-o membrană, iar restul de discuri, obţinute din aceeaşi membrană, se folosesc pentru filtrări în vederea determinării dimensiunilor particulelor de virus. Operaţia de ultrafiltrare trebuie făcută respectînd regulile filtrării prin bujii Chamberland sau Bertkefeld. Materialul de filtrat — lichide, triturate în organe etc. — este pus în suspensie în bulion cu pH=7,4—7,6. Particulele mari din ţesuturi sînt eliminate fie trecînd suspensia prin hîrtie de filtru, fie prin centrifugare şi, în cele din urmă, filtrînd-o prin membrane de colodiu cu porii mari. Lichidul astfel pregătit va fi trecut prin membrane filtrante de diferite porozităţi, însemnînd porozitatea membranei care permite trecerea tuturor particulelor virulente şi pe aceea care opreşte toate particulele virulente care se găsesc în lichid. Între aceste două feluri de membrane se găsesc altele care opresc parţial virusul şi îl opresc cu atît mai mult, cu cît dimensiunile porilor se apropie de dimensiunile particulelor de virus. Prezenţa totală sau parţială, precum şi absenţa virusului în filtrat se dovedesc prin inoculări la animale de experienţă receptive. Filtratul care conţine toate particulele de virus, care existau în lichidul iniţial, va produce la animal aceeaşi reacţie şi cu aceeaşi diluţie ca şi acesta din urmă. Diluţia activă pentru animal va scădea însă pe măsură ce ne apropiem de membrana ai cărei pori opresc total virusul şi al cărui filtrat nu va mai produce în doze oricît de mari vreo reacţie la animalul de experienţă sensibil.

Dimensiunile particulelor virulente se calculează în raport cu dimensiunile porilor filtrului care a oprit total trecerea virusului. Virusul nu are însă dimensiunile porilor, ci particulele sale sînt ceva mai mici decît diametrul porilor. Această diferenţă se datoreşte faptului că particulele nu trec singure prin pori, ci între ele şi pereţii porilor se interpune un strat de apă, care este cu atît mai important cu cît porii sînt mai mici.

S-au stabilit, pentru membrane de diverse porozităţi, factori de corecţie *(F)*, adică cifra cu care trebuie înmulţită valoarea numerică a diametrului porilor pentru a afla dimensiunile particulelor.

Iată care sînt aceste cifre pentru trei grupe de membrane:

F=0,3—0,5 pentru membrane ale căror pori variază de la 10—100 milimicroni;
F=0,5—0,75 pentru membrane ale căror pori variază de la 100—500 milimicroni;
F=0,75—1 pentru membrane ale căror pori variază de la 500—1 000 milimicroni.

Un virus ale cărui particule au fost oprite de o membrană, avînd porii cu diametrul de 100 milimicroni, va avea dimensiunile cuprinse între 30 şi 50 milimicroni. Tot aşa o particulă care este oprită de o membrană cu porii de 1 000 milimicroni va avea dimensiunile cuprinse între 750 şi 1 000 milimicroni.

Scanned with OKEN Scanner

ALTE METODE DE DETERMINARE A DIMENSIUNILOR VIRUSURILOR

DETERMINAREA DIMENSIUNILOR VIRUSURILOR PRIN ULTRACENTRIFUGARE

Virusurile filtrabile, datorită unor factori fizici ca : difuziunea, agitaţia termică, viscozitatea şi, mai ales, redusei diferenţe de densitate dintre particulele de virus şi lichidul în care acestea se găsesc, nu se sedimentează prin forţa gravităţii. Centrifugarea la o viteză mare poate însă separa particulele de virus de mediul ambiant, permiţînd astfel atît purificarea unor virusuri, separarea lor de materiile organice, cît şi determinarea dimensiunilor lor. Centrifugele capabile să realizeze separarea virusului trebuie să aibă un număr mare de turaţii.

S-au imaginat şi construit asemenea centrifuge numite încă şi ultracentrifuge. Ele au o viteză de 18 000—60 000 de turaţii pe minut sau mai mult. Unele centrifuge sînt prevăzute cu o ferestruică de cuarţ, care permite să se urmărească, prin metode optice, procesul de sedimentare al particulelor care se găsesc în lichidul supus operaţiei. Dimensiunile virusului se determină prin calcul şi ele sînt în funcţie de o serie de constante care trebuie în prealabil precizate.

DETERMINAREA DIMENSIUNILOR VIRUSURILOR PRIN SENSIBILITATEA LOR FAŢĂ DE EMANAŢIILE DE RADIU

Sensibilitatea faţă de emanaţiile radiului poate fi folosită la determinarea dimensiunilor particulelor de virus, întrucît se constată o relaţie directă între sensibilitatea unui virus la acţiunea destructivă a radiaţiilor şi dimensiunile sale şi anume, cu cît dimensiunile sale sînt mai mari, cu atît el este mai sensibil.

Cercetările au fost făcute pe diverse tulpini de virus bacteriofag. Autorii (soţii W o l l m a n n), în vederea determinării dimensiunilor unui bacteriofag, supuneau radiaţiilor suspensia de cercetat. Timpul de expunere varia de la o experienţă la alta. După fiecare expunere, diluţii din suspensia iradiată erau etalate pe plăci Petri cu agar, însămînţate, în prealabil, cu bacteria sensibilă. A doua zi se numărau zonele de liză şi numărul aflat se compara cu cel obţinut prin însămînţare, în aceleaşi condiţii, a suspensiei de bacteriofag neiradiată. Se determina, astfel, procentul în care particulele de bacteriofag erau distruse într-un anumit timp de iradiere. Autorii constată pentru acelaşi timp de iradiere diferenţe de la un bacteriofag la altul. Bacteriofagii cu dimensiuni mai mari — dimensiuni determinate prin filtrare — erau într-un procent mai important distruşi prin acelaşi timp de iradiere.

DETERMINAREA DIMENSIUNILOR VIRUSURILOR PRIN SENSIBILITATEA LA CĂLDURĂ

Cercetările au dovedit că există un raport direct între rezistenţa la căldură şi dimensiunile particulelor de bacteriofag şi deci, cu cît aceste dimensiuni sînt mai mari, cu atît particulele sînt mai rezistente.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatele obținute prin acest procedeu concordă, în general, cu cele obținute prin ultrafiltrare. Se constată și unele neconcordanțe, și anume, că unele virusuri cu particule mai mici sînt mai rezistente decît altele cu particule mai mari ceea ce reduce valoarea metodei.

DIMENSIUNILE ȘI FORMA VIRUSURILOR

Ultrafiltrarea, ultracentrifugarea, capacitatea de difuziune și, în ultimul timp, fotografierea imaginilor obținute în special cu microscopul electronic au permis determinarea dimensiunilor și formei particulelor virulente ale virusurilor cu o precizie satisfăcătoare. Rezultatele obținute prin diverse metode sînt asemănătoare, ceea ce dovedește că fiecare metodă folosită izolat dă dimensiunile reale ale virusurilor. În tabelele 23, 24 și 25, sînt prezentate după datele din literatură dimensiunile virusurilor mai importante, în comparație cu alte particule ca: globulul roșu uman, diferite bacterii, molecule de proteină, precum și alte date referitoare la virusuri.

Tabelul 23

Diametrele particulelor de virus în comparație cu diametrele altor particule

Corpusculul	Diametrul sau lungimea și lățimea în milimicroni
Globulul roșu	7 500
Staphylococcus pyogenes	800—1 000
Brucella melitensis	400
Rickettsia prowazekii (agentul tifosului exantematic)	250—450
Virusul limfogranulomatozei venerice	300—400
Virusul psitacozei	200—300
Virusul vaccinal	170—230
Virusul mixomului infecțios al iepurelui	175
Virusul bolii canarilor	175
Virusul agalaxiei oilor și caprelor (formele corpusculare)	125—250
Virusul peripneumoniei bovideelor	125—250
Virusul ectromieliei	125—250
Virusul bolii lui Aujeszky	150
Virusul herpetic	150
Virusul rabic fix	150
Virusul bolii de Borna	125
Virusul influenței	125
Virusul stomatitei veziculoase	120
Bacteriofagul stafilococic	100
Virusul pseudopestei sau maladiei de New Castle sau pestei asiatice	90
Virusul pestei aviare	80—100
Virusul bacteriofag G_{16}	75
Virusul sarcomului lui Rous	75
Virusul anemiei infecțioase a calului	70
Virusul mozaicului tutunului	18—50
Virusul mozaicului castravetelui 3 și 4	430 × 12,3

Continuare tabelul 23

Corpusculul	Diametrul sau lungimea și lățimea în milimicroni
Virusul mozaicului inaparent sau latent al cartofului	430 × 9,8
Virusul papilomului iepurelui (Shope)	40
Virusul encefalomielitei calului	38
Virusul bacteriofag al speciei Bacillus magatherium	30
Virusul febrei văii Rift	30—40
Virusul jigodiei carnasierelor	28
Virusul bolii „Buchistunt" a tomatelor	26
Virusul bolii „Ringspot" a tutunului	22
Virusul febrei galbene	19
Virusul bolii Loupingill	12
Virusul poliomielitei umane	10
Virusul febrei aftoase	8—10
Virusul poliedriei sau gălbinarei viermelui de mătase	10
Virusul bacteriofag stafilococic S	59 × 13,2
Molecula de hemocianină	28 × 0,6
Hemoglobina de cal	18 × 0,6
Ovalbumina	

Tabelul 24

Greutatea moleculară a proteinelor și greutatea moleculară a particulelor de virus (după Kuzin)

		Greutatea moleculară
ALBUMINE	Albumină serică	70 000
	Ovalbumina	40 000
	Globulina serică	150 000
	Ureaza	483 000
	Hemocianina	6 000 000
VIRUSURI	Virusul febrei aftoase	400 000
	Virusul influenței A	650 000
	Virusul poliomielitei	750 000
	Virusul bacteriofag coli	25 000—36 000 000
	Virusul encefalitei cailor	23 000 000
	Virusul mozaicului tutunului	50 000 000
	Virusul sarcomului găinilor	139 000 000
	Virusul bacteriofag stafilococic	500 000—300 000 000
	Virusul vaccinal	2 300 000 000

Tabelul 25

Variații ale densității substanței diferitelor specii de virus în raport cu apa și cu proteinele

Substanța	Densitatea
Apa	1
Moleculele de proteină	1,33
Virusul mozaicului tutunului	1,3
Virusul vaccinal	1,18
Virusul bacteriofag stafilococic	1,20
Virusul influenței	1,1

Scanned with OKEN Scanner

Examinarea datelor din tabelele 23, 24 și 25 arată că:

1. Dimensiunile virusurilor filtrabile variază în limite destul de largi și anume de la 10 la 300 milimicroni.

2. Unele particule de virus au dimensiuni și greutăți moleculare mai reduse ca unele mari molecule proteice cum este hemocianina.

3. Particulele de virus pot avea forma rotundă, alungită sau filamentoasă. Virusurile care în tabel figurează cu două dimensiuni au o formă alungită, iar cele cu o singură dimensiune formă rotundă. Virusurile de formă alungită se apropie, prin aspectul și dimensiunile lor, de moleculele proteice. Moleculele de hemocianină, de exemplu, au o formă filamentoasă, măsurînd 15 milimicroni lungime și 3 milimicroni lățime.

4. Greutatea moleculară a particulelor variază în limite largi, chiar pentru aceeași specie de virus.

Astfel, bacteriofagul stafilococic este constituit din particule a căror greutate moleculară variază de la 500 000 la 3 000 000, iar bacteriofagul coli de la 25 000 la 36 000 000. Aceste variații sînt în legătură cu numeroși factori. Unul din acești factori este reprezentat prin concentrația particulelor în lichid. Se constată, astfel, că în diluții mari de bacteriofag coli numărul particulelor mici este mai însemnat ca în lichidele cu o concentrație mare. Diferențele de dimensiuni ar putea fi explicate prin procese de agregare. Particulele mici se agregă în lichidele cu o concentrație ridicată în elemente virulente, dînd particule de greutate mare.

SARCINA ELECTRICĂ A VIRUSURILOR

Numeroase cercetări făcute în scopul determinării sarcinii electrice a particulelor de virus ale diverselor specii au arătat că acestea, în medie, au o reacție neutră sau aproape neutră și o sarcină electrică negativă.

Folosindu-se ca mijloc de cercetare catoforeza, s-a constatat, într-adevăr, că virusurile turbării, febrei aftoase, diftero-variolei păsărilor, poliomielitei umane (Olitsky și col. 1929) etc. merg la anod. Punctul izoelectric este variat, după cercetările făcute pînă în prezent, de la un virus la altul. El a fost, de exemplu, la pH = 4,3—4,6 pentru virusul vaccinal, la pH=9,3 pentru virusul febrei aftoase etc.

Sarcina electrică a virusurilor influențează filtrarea, adsorbția și, foarte probabil, tipul patogenității unei specii de virus.

MULTIPLICAREA VIRUSURILOR

Virusurile se multiplică, dar aspectul morfologic al multiplicării este pînă în prezent necunoscut. S-ar putea presupune că ele se multiplică, ca și bacteriile, prin diviziune directă, însă examenele repetate făcute asupra unui număr însemnat de specii de virus cu optica electronică nu au surprins niciodată vreuna din fazele unei asemenea multiplicări. Nu s-au identificat, într-adevăr, nici figuri de mitoză și nici măcar corpusculi de dimen-

Scanned with OKEN Scanner

siuni mai mari sau mai mici. Lipsa unor asemenea figuri în imaginile electronice a făcut pe Suhov să presupună că virusurile se multiplică printr-un alt mecanism decît celelalte vieţuitoare. Autorul apropie multiplicarea virusurilor de multiplicarea moleculelor proteice, care, corform ipotezei emise de Bresler, se nasc dintr-o dată şi cu o asemenea viteză încît fazele dimensionale intermediare nu pot fi surprinse.

Scanned with OKEN Scanner

FIZIOLOGIA VIRUSURILOR

COMPOZIȚIA CHIMICĂ

Studiul compoziției chimice a virusurilor filtrabile întîmpină greutăți în special din două motive și anume: pe de o parte fiindcă particulele de virus nu pot fi obținute în stare perfect pură, adică într-un lichid (apă distilată) să nu se găsească alte substanțe decît acelea care constituie particulele virulente [1] iar pe de altă parte pentru că nu se pot obține, de regulă, cantități însemnate de particule virulente.

Aceste două dificultăți nu au putut fi încă înlăturate complet, în special la virusurile patogene pentru animale și de aceea compoziția lor chimică nu este decît aproximativ cunoscută. În ceea ce privește virusurile patogene pentru plante, aceste dificultăți au fost învinse și în consecință compoziția lor chimică a putut fi mai bine studiată. Rezistența lor față de reactivii chimici a permis completa lor purificare. Materialul infectat conține cantități relativ mari de particule virulente. Astfel, 1 litru de sevă din frunzele infectate dă 2 g de virus pentru mozaicul roșiilor, 0,15 g pentru mozaicul spanacului, 1 g pentru mozaicul latent al gutuiului etc.

În general, 10% din materialul infecțios (frunze) uscat este constituit de elemente virulente.

Purificarea și obținerea în stare cristalizată a virusului mozaicului tutunului s-a realizat, inițial, de S t a n l e y (1935) prin următorul procedeu.

Plantele tinere și infectate sînt tăiate în bucăți mici, înghețate și apoi triturate; trituratul, după dezghețare, se stoarce printr-o pînză. Se obține un suc care este adus la pH=7,2 cu sodă (NaOH) normală sau decinormală. Sucul adus la pH=7,2 se amestecă din nou cu trituratul inițial și

[1] Unele cercetări recente au arătat că particula de virus poate fi cuplată cu molecule provenind din organismul infectat. S-a dovedit, de exemplu, că virusul pneumoniei șoarecilor, care era socotit ca avînd diametrul de 140 milimicroni, nu are în realitate decît 40 milimicroni. Într-adevăr, din particula virulentă de 140 milimicroni s-a separat virusul în stare pură, care are numai 40 milimicroni, restul fiind proteină organică.

Scanned with OKEN Scanner

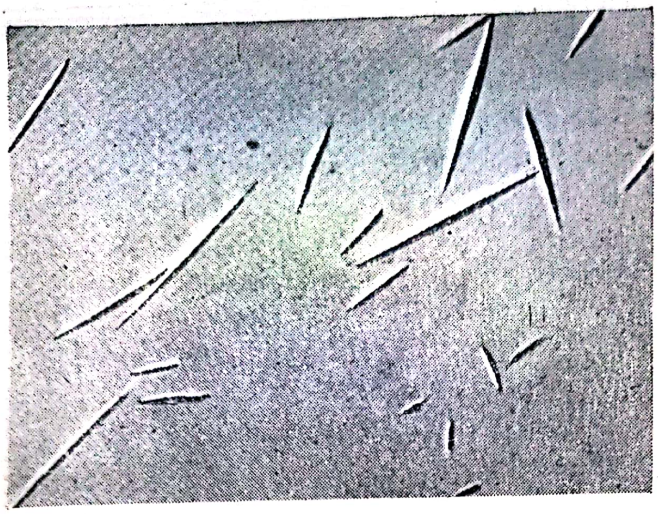


Fig. 39 — Virusul mozaicului tutunului sub forma cristalizată (cristale filiforme) (după **Stanley**)

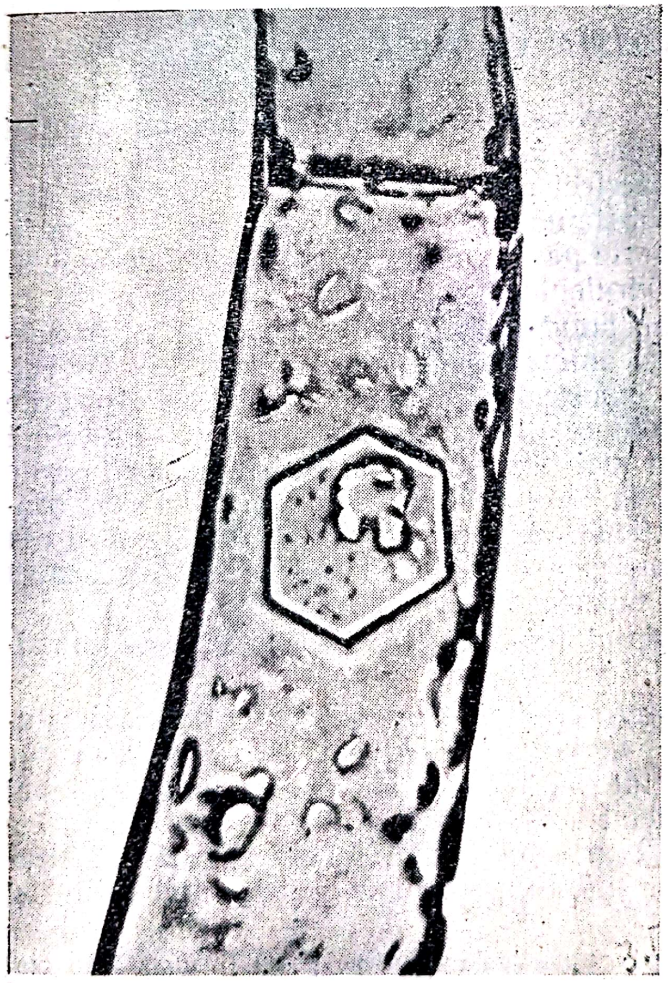


Fig. 40 — Cristal hexagonal de virus în celula unui perișor de pe frunza de *Nicotiana* (după **Kausche**)

totul se trece printr-un filtru de celită. Filtratul astfel obținut și care conține virusul se tratează cu SO_4H_2, care se adaugă pînă la concentrația de 30% din greutatea mustului folosit. Se formează un precipitat care se separă prin filtrare. Precipitatul rămas pe filtru, și care conține virusul, este dizolvat în apă în proporție de 1%. Se ajustează pH-ul la cifra de 7 și apoi proteidele se precipită din soluția cu sulfat de amoniu în concentrație de 11%. Această operație de purificare (dizolvarea în apă și precipitare cu sulfat de amoniu 11%) se repetă de 2—3 ori. Ultima soluție de proteine este adusă la pH=4,5, cînd se produce precipitarea substanței. Precipitatul se separă prin filtrare printr-o membrană de celită. Membrana și precipitatul se trec în apă, unde proteida se dizolvă. Celita se separă prin trecerea printr-un filtru Buchner. Filtratul obținut este opalescent și virulent. Virusul conținut de acest filtrat se precipită sub formă de cristale fine. Cristalizarea se obține adăugînd filtratului:

1. soluție saturată de sulfat de amoniu pînă se obține o ușoară tulburare;

2. soluție de acid acetic 10% într-o soluție semisaturată de sulfat de amoniu, în cantitate necesară pentru a obține pH = 5,5;

3. un volum convenabil de sulfat de amoniu, care duce la precipitarea totală a proteidei virulente.

Cristalele, obținute prin acest procedeu, reprezintă vi-

rusul însuşi. Intr-adevăr, aceste cristale, purificate în repetate rînduri şi eliberate astfel de orice impurităţi sînt capabile să reproducă infecţia, caracteristică virusului din care provin, în diluţii foarte mari. Astfel, 1 g de substanţă cristalizată, diluată în 100 miliarde litri de apă, dă o soluţie care are încă proprietăţi infectante. Primele cristale obţinute măsurau 200—350μ, aveau forma aciculară şi erau vizibile la microscop. S-au obţinut apoi cristale de dimensiuni mai importante. Rîjkov (tot în 1935) obţine, printr-un procedeu similar, virusul mozaicului tutunului sub forma cristalizată. Dintre virusurile patogene pentru animale, virusul poliomielitei umane a putut fi obţinut sub formă de proteină cristalizată în 1942. Virusul poliedriei viermilor de mătase se găseşte sub formă de cristale chiar în celulele parazitate.

Diverşi cercetători (Suhov şi col. 1943, Gorodskaia, 1950 etc.) au pus la punct metode simplificate pentru obţinerea diverselor virusuri vegetale sub forma cristalizată.

Toate aceste cercetări au arătat deci că elementul virulent este reprezentat printr-o proteidă cristalizabilă asemănătoare, din acest punct de vedere, cu proteidele nevirulente. Analiza chimică a acestui complex a arătat că cristalele conţin acid nucleic şi că sînt constituite, în consecinţă, nu din molecule de proteină simplă, ci din molecule de proteină complexă şi anume de nucleoproteină. Unele virusuri sînt constituite din molecule de nucleoproteide cuplate cu lipide. Acest fapt a făcut pe Rîjkov (1947) să propună ca virusurile să fie împărţite în două mari grupe şi anume: virusuri nucleoproteidice şi virusuri liponucleoproteidice.

Produsele virulente, mai mult sau mai puţin purificate, au fost analizate chimic, stabilindu-se compoziţia elementară, precum şi natura substanţelor complexe (proteine, acizi nucleici, lipide, hidraţi de carbon), care constituie particulele virulente.

Analiza elementară a fost făcută pentru diverse virusuri şi rezultatele obţinute de diverşi cercetători sînt rezumate în tabelul 26.

Tabelul 26

Principalele elemente ce intră în compoziţia virusurilor
(după date din literatură)

Specia de virus	Metode de izolare	C	H	N	P	S	Cenuşă
		Conţinutul în procente faţă de substanţa uscată					
Virusul vaccinal	Ultracentrifugare (corpusculi elementari)	33,7-34,2	—	15,3	0,57-0,8	—	Urme
Virusul sarcomului Rous	Ultracentrifugare, după îndepărtarea lipidelor	62,2	9,2	7,7	0,8-1,03	—	1,7
Virusul encefalomielitei	Ultracentrifugatul virusului monodispersat	—	—	14,1	1,2	—	—
Virusul papilomului iepurilor	Sediment monodispersat ultracentrifugat	49,5	7,2	10,9	0,94	2,2	2,5

Continuare tabelul 26

Specia de virus	Metode de izolare	C	H	N	P	S	Cenuşă
		Conţinutul în procente faţă de substanţa uscată					
Virusul Lycopersicum	Precipitarea virusului cristalizat	48,5	7,7	16,1	1,4	0,6	3,0
Virusul Cucumis	Precipitarea virusului cristalizat	50,7	6,98	15,37	0,54	0,84	2,2
Virusul X sau mozaicul latent al cartofului	Cristale fluide	47,7-49,5	7,1-7,7	15,7-17	0,4-0,5	—	2,2-5
Virusul bacteriofag coli	Ultrafiltrare	42	6,4	18,2	3,7	—	—
Virusul bacteriofag coli	Precipitare cu sulfat de amoniu	40	5,3	14,3	4,8	—	—
Virusul bacteriofag coli	Ultrafiltrare	49,3	7,8	14	0,07	—	0,97
Virusul bacteriofag coli	Adsorbţie şi eluţie	—	—	5,3	—	—	—
Virusul bacteriofag coli	—	—	—	13,4	—	—	6,0
Virusul mozaicului tutunului	—	49,3	7,2	14,4	0,45	0,24	1,5
Virusul pseudopestei aviare	—	51,8	—	9,9	0,85	—	—
Virusul influenţei	—	53	—	10	0,9	—	—
Virusul alfa mozaic	—	53,8	—	6,7	16,2	1,4	0,65
Virusul necrozei tutunului	—	45	—	6,5	16,3	1,6	1,6

Scanned with OKEN Scanner

S-a stabilit, la fel, proporţia diverşilor complecşi chimici care constituie particula virulentă pentru o parte din speciile de virus. Reiese din datele rezumate în tabelul 27 că particulele virulente conţin cantităţi impor-

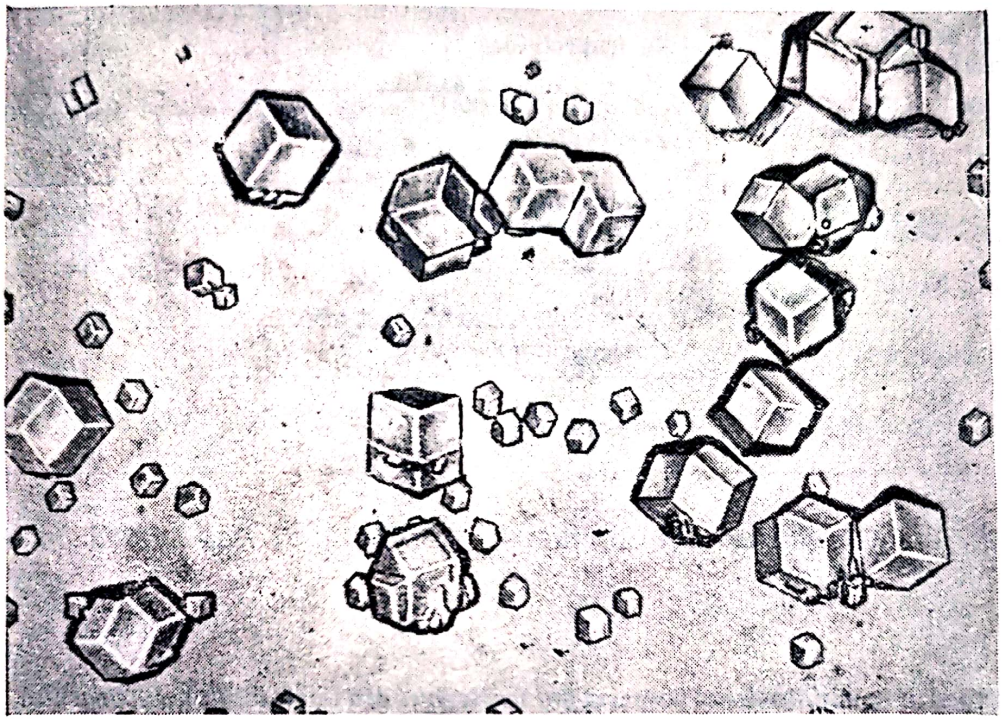


Fig. 41 — Cristale în dodecaedri ale virusului Bushy Stunt (după **Bawden şi Pirie**)
Cristalele mari provin de la o primă precipitare cu sulfat de amoniu, cele mici de la o a doua precipitare

tante de materii proteice. Procentul de proteină variază de la 50 la 100%. Natura proteinelor a fost cercetată pentru unele virusuri, stabilindu-se de exemplu, că proteina mozaicului tutunului se apropie, prin structura sa, de globulină, avînd o reacţie uşor acidă. Se pare, după datele obţinute pînă în prezent, că virusurile nu conţin proteine bazice de tipul protaminei sau histonelor. Nu este exclus, totuşi, ca unele virusuri, care conţin cantităţi importante de acid nucleic, să aibă în constituţia lor proteine bazice.

Compoziţia chimică a unor virusuri *Tabelul 27*
(după date din literatură)

Specia de virus	Albumină	Lipide	Glucide	Cenuşă
	Conţinutul în procente faţă de substanţa uscată			
Virusul sarcomului Rous	41	50	2,1	2,5
Virusul vaccinal	83,12	8,68	2,06	0,79
	—	8,10	3,3	2,3
	92	5,7	2,8	—
Virusul encefalomielitei	42	51	4,0	—
Virusul papilomului iepurilor	92	1,46	6,5	2,5

Continuare tabelul 27

Specia de virus	Albumină	Lipide	Glucide	Cenuşă
	Conţinutul în procente faţă de substanţa uscată			
Virusul mozaicului tutunului	Nucleoproteide	—	2,5	2,0
Virusul X sau mozaicul latent al cartofului	Nucleoproteide	—	2,5	2,0
Virusul Lycopersicum	Nucleoproteide	—	5,5	3,0
Virusul bacteriofag coli	82	10	2,5	5,4
Virusul bacteriofag	Nucleoproteide	—	—	—
Virusul bacteriofag coli	Nucleoproteide	—	1,5	—

S-au determinat apoi aminoacizii (tabelul 28) care intră în compoziţia unor virusuri.

Tabelul 28

Conţinutul în aminoacizi al preparatelor foarte pure din unele tulpini ale virusului mozaicului tutunului (după **Knight, 1947**)

Aminoacidul	Diverse tulpini ale virusului mozaicului tutunului								
	T.M.V.	M J_{14}	D_1	G. A.	YA	HR	C V_3	C V_4	MD
	Concentraţia în procente a diverşilor aminoacizi								
Alanina	5,1	5,2	4,8	5,1	5,1	6,4		6,1	0,2
Arginina	9,8	9,9	10,0	11,1	12,2	9,9	9,3	9,3	0,2
Acidul aspartic ..	13,5	13,5	13,4	13,7	13,8	12,6	—	13,1	0,2
Cisteina	0,69	0,67	0,64	0,60	0,70	0,70	—	—	—
Cistina	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acidul glutamic ..	11,3	11,5	10,4	11,5	11,3	15,5	6,4	6,5	0,2
Glicina	1,9	1,7	1,9	1,9	1,8	1,3	1,2	1,5	0,1
Histidina	—	—	—	—	—	0,72	—	—	0,41
Izoleucina	6,6	6,7	6,6	5,7	5,7	5,9	5,4	4,6	0,2
Leucina	1,47	1,49	1,95	1,45	1,47	1,51	2,55	2,43	0,04
Metionina	—	—	—	—	—	2,2	—	—	0,1
Fenilalanina	8,4	8,4	8,4	8,3	8,4	5,4	9,9	9,8	0,2
Prolina	5,8	5,9	5,5	5,8	5,7	5,5	—	5,7	0,2
Serina	7,2	7,0	6,8	7,0	7,1	5,7	9,3	9,4	0,3
Treonina	9,9	10,1	10,0	10,4	10,1	8,2	6,9	7,0	0,1
Triptofanul	2,1	2,2	2,2	2,1	2,1	1,4	0,5	0,5	0,1
Tirozina	3,8	3,8	3,9	3,7	3,7	6,8	3,8	3,7	0,1
Valina	9,2	9,0	8,9	8,8	9,1	6,2	8,8	8,9	0,2

Se constată din datele tabelului 28 că diversele tulpini de virus ale mozaicului tutunului diferă între ele în ceea ce priveşte felul şi cantitatea de aminoacizi conţinuţi, ceea ce ar fi în legătură şi ar explica diferenţele

Scanned with OKEN Scanner

biologice (tipul de patogenitate) dintre tulpini. O imagine chimică dă deci anumite atribute biologice virusului.

Cercetătorii sovietici au stabilit relaţiile cantitative dintre aminoacizii prezenţi în corpusculii bacteriofag şi bacteria pe care bacteriofagul se dezvoltă, aşa cum se vede din tabelul 29.

Tabelul 29

Conţinutul în aminoacizi al virusului bacteriofag T_4 în comparaţie cu Escherichia coli
(după **I. F. Leontiev**[1], 1949)

Aminoacidul	Bacteriofag T_4	Escherichia coli
	Conţinutul de aminoncizi în procente	
Asparagina	11,97	9,57
Glutamina	11,97	9,59
Serina	4,37	4,98
Glicina	7,34	7,94
Treonina	7,00	5,31
Alanina	9,40	8,40
Valina	6,51	5,00
Metionina	1,30	2,92
Fenilalanina	4,16	4,80
Izoleucina	3,90	4,63
Leucina	6,51	8,68
Triptofanul	—	1,29
Prolina	5,00	3,02
Tirozina	3,74	4,33
Arginina	6,51	8,21
Lizina	8,46	2,26
Histidina	2,60	3,28

[1] Cifrele au fost obţinute prin microanaliză cromatografică (metoda Ţvet) şi reprezintă procente din cantitatea totală de aminoacizi.

Conţinutul în acid nucleic a fost stabilit de diverşi autori (tabelul 30).

Tabelul 30

Conţinutul în acid nucleic al unor virusuri

Specia de virus	Conţinutul de acid nucleic în procente
Virusul vaccinal	5,6—6,6
Virusul papilomului iepurilor	6,8
Virusul encefalomielitei	4,4
Virusul tomatelor	15—20

Cantitativ, s-a precizat că 1 ml dintr-o suspensie de bacteriofag T_2 cu titru, $4{,}8 \times 10^{-11}$ conţine 0,306 mg de acid nucleic (Cohen 1947).

Natura acizilor nucleici a putut fi precizată pentru unele virusuri. Astfel, acidul nucleic, izolat din virusul influenţei sau din virusul bacteriofag

T_2, este de tipul acidului timonucleic (dezoxiribonucleic), în timp ce cel găsit în virusurile patogene pentru plante ca şi în cele mai multe virusuri bacteriofag, în virusul encefalomielitei cailor, în virusul febrei aftoase etc. este de tipul acidului zimonucleic (ribonucleic). În general, acidul ribonucleic este prezent la cele mai multe virusuri, în timp ce acidul dezoxiribonucleic se găseşte la un număr mai restrîns de specii şi uneori în amestec cu cantităţi mici de acid ribonucleic, aşa cum se vede în tabelul 31.

Tabelul 31

Tipul şi cantitatea de acizi nucleici găsiţi la unele virusuri

Specia de virus	Acid ribonucleic	Acid dezoxiribonucleic
	Cantitatea în procente	
Virusul encefalomielitei cailor	4,4	—
Virusul influenţei	3	2
Virusul vaccinal	—	5,6
Virusul pseudopestei aviare	1,1	—
Virusul papilomului Shope	—	9
Virusul mozaicului tutunului	6	—
Virusul necrozei tutunului	18	—
Virusul bacteriofag coli	—	37
Virusul mozaicului tutunului	40	—

Este de remarcat că particulele unei specii de virus au, de regulă, un singur tip de acid nucleic, spre deosebire de celulele cu metabolism propriu la care se găsesc ambii acizi nucleici. Acizii nucleici din particulele de virus conţin tot fosforul particulei, ceea ce înseamnă că în particulă nu se mai găsesc şi alţi compuşi fosforaţi. Acizii nucleici par a se găsi la suprafaţa moleculei nucleoproteinice. Ei pot fi desfăcuţi, prin acţiunea nucleotidazei (ferment), de legăturile lor cu albumina şi aceasta din urmă, după deslipirea acizilor nucleici, conservă aceeaşi greutate moleculară, se cristalizează şi se comportă, în reacţiile serologice, ca şi particula de virus.

Mai departe s-a putut stabili, pentru unele virusuri, aşa cum se vede în tabelul 32, raporturile cantitative dintre proteine, acizi nucleici şi lipide.

Tabelul 32

Conţinutul unor virusuri în proteine, acizi nucleici şi lipide

Specia de virus	Proteine	Acizi nucleici	Lipide
	Conţinutul în procente		
Virusul papilomului iepurilor	89,5	9	1,5
Virusul encefalomielitei cailor	45	4,4	48
Virusul influenţei	67	5	23
Virusul pseudopestei aviare	67	6	27
Virusul vaccinal	83	5,6	4

Scanned with OKEN Scanner

Continuare tabelul 32

Specia de virus	Proteine	Acizi nucleici	Lipide
	Conținutul în procente		
Virusul bacteriofag T_2	50	45	2
Virusul mozaicul tutunului	94	6	—
Virusul necrozei tutunului	82	18	—
Virusul mozaicului latent al cartofului.....	92	6	—
Virusul Ribgras	94	6	—
Virusul 4 al castravetelui	94	6	—
Virusul alfa mozaic	85	15	—

Aceste analize chimice au fost făcute pe produse de mare puritate și pe baza lor se poate constata că unele virusuri patogene pentru plante sînt constituite numai din proteine și acizi nucleici. Raporturile dintre cele două componente variază foarte mult de la un virus la altul, așa cum se poate vedea, la fel, din tabelul 32. Se mai poate observa că unele virusuri patogene pentru animale conțin proporții importante de lipide. Nu trebuie să uităm că puritatea produselor analizate este departe de a fi absolută și nu poate fi comparată cu aceea sub care se obțin virusurile patogene pentru plante.

În consecință, virusurile parazite la plante sau bacterii ca și virusurile de dimensiuni reduse, patogene pentru animale, sînt constituite din molecule nucleoproteidice de același fel, sînt deci agregate izomoleculare. Ele nu conțin apă, ceea ce le deosebește de bacterii și alte viețuitoare care conțin cantități mari de apă, 80—90%.

Virusurile de dimensiuni mai mari — virusul vaccinal în special — conțin, pe lîngă molecule de nucleoproteidă, și alți componenți ca lipide, glucide, proteine serologic distincte, ca biotina, riboflavina etc., precum și cantități însemnate de apă. Aceste virusuri se apropie deci, prin compoziția lor chimică, de celulele bacteriene.

METABOLISMUL VIRUSURILOR

Procesele de asimilație și dezasimilație sînt efectuate, la toate viețuitoarele, prin intermediul fermenților. Virusurile filtrabile, spre deosebire de toate ființele cunoscute, sînt lipsite, total sau parțial, de fermenți, astfel că ele nu pot să-și sintetizeze materia proprie din substanțe inerte. Unele virusuri conțin însă un redus echipament enzimatic. În particula bacteriofagului coli, de exemplu, există o fosfatază, iar în cea a virusului vaccinal o serie de fermenți cum sînt ribonucleaza, dezoxiribonucleaza, fosfataza, riboflavina etc. Virusul influenței umane posedă o mucinază care se pare că atacă mucina celulelor mucoaselor respiratorii și intestinale, precum și pe aceea a hematiilor, permițîndu-i astfel, probabil, pătrunderea în aceste celule. Dehidrogenaze nu au fost puse însă în evidență, pînă în prezent, la nici un virus, și de aici lipsa totală de activitate a particulelor

Scanned with OKEN Scanner

virulente în prezența oxigenului. Tot așa se explică faptul că virusurile, în afara mediului lor de multiplicare, nu au nici o activitate metabolică.

Lipsa totală sau parțială a unui echipament enzimatic face ca nutriția virusurilor filtrabile să aibă, în raport cu a celorlalte viețuitoare, un caracter particular. Această particularitate distinge ultravirusurile de celelalte microorganisme mai mult decît filtrabilitatea, invizibilitatea la microscopul cu lumină sau dimensiunile lor.

Virusurile, într-adevăr, nu se pot multiplica în mediile curent folosite în bacteriologie, ca bulionul de carne, geloza nutritivă, laptele etc. Neavînd fermenți, ele nu pot constitui, din substanțele inerte care compun aceste medii, materia lor proprie. Pentru a constitui această materie proprie este necesar să aibă la dispoziție o celulă vie, care să sintetizeze, prin fermenții ei, complecșii chimici care caracterizează particula virulentă. Virusul utilizează, pentru sintezele sale, echipamentul enzimatic al celulei receptive. El nu se reproduce deci singur, ci este reprodus de celula parazitată. Cercetările recente au arătat, într-adevăr, că sub influența virusului sinteza nucleoproteidelor normale ale frunzelor parazitate se reduce, ceea ce arată că activitatea echipamentului enzimatic al celulei parazitate a fost deviat, fiind obligat să sintetizeze nucleoproteida virus. La fel, s-a mai constatat că *Escherichia coli* care, în condiții normale, sintetizează de trei ori mai mult acid ribonucleic decît acid dezoxiribonucleic, sub influența bacteriofagului specific (T_2 sau T_4), își modifică metabolismul și sintetizează exclusiv acid dezoxiribonucleic, singurul acid nucleic care se găsește în tulpinile de bacteriofag care au fost folosite de experimentatori. Mai departe și în același sens, s-a arătat că celulele speciei *Esch. coli* infectate cu bacteriofag nu mai sintetizează nici un compus proteinic propriu, ci numai componenți protidici caracteristici particulei de bacteriofag. Sub influența virusului se produce deci o totală deviere a metabolismului celular (Klein, 1954). Această deviere nu se traduce însă printr-o reducere a consumului de oxigen care rămîne același la celulele bacteriene normale sau parazitare. Aceasta înseamnă că celula parazitată este vie și continuă să-și procure energie, însă această energie este folosită pentru a sintetiza materia constituentă a parazitului.

Se mai poate aminti în sprijinul acestei teze constatarea că fosforul radioactiv cu care a fost alimentată o tulpină de tutun se găsește în virusul care parazitează frunzele acestei tulpini, ceea ce constituie o dovadă că elementele trec din plantă în virus, că virusul se reproduce pe socoteala elementelor care compun planta.

METODE DE CULTIVARE A VIRUSURILOR

CULTIVAREA VIRUSURILOR ÎN CONDIȚII NATURALE

Virusurile în condiții naturale se cultivă în celulele și țesuturile animalelor, plantelor sau bacteriilor receptive. În acest fel, s-a cultivat și întreținut, de exemplu, virusul rabic care de mii de ani a fost trecut, în mod neîntrerupt, de la un animal la altul și a ajuns, astfel, pînă în zilele noastre. Aceste treceri neîntrerupte au fost absolut necesare păstrării lui, căci el ar

fi dispărut complet de pe faţa pămîntului dacă, într-un singur moment, nu ar fi existat nici un animal turbat sau purtător de virus rabic. Virusul şi boala respectivă vor dispare pentru totdeauna cînd pe pămînt nu va mai fi nici un animal purtător de virus rabic capabil să-l transmită altor animale.

Virusurile se multiplică în organismul viu şi, în laborator, pentru a multiplica un virus se recurge, de cele mai multe ori, la metodele naturii. Astfel pentru a realiza multiplicarea virusului pestei porcine, se injectează un porc receptiv cu o cantitate mică din acest virus. Virusul se multiplică, porcul se îmbolnăveşte şi în momentul culminant al bolii se recoltează sîngele animalului în care se găsesc cantităţi considerabile de virus, în raport cu cantitatea injectată. La fel, injectînd o cantitate relativ mică de virus rabic unui animal receptiv, acesta se îmbolnăveşte şi după moarte se găsesc cantităţi mari de virus în creierul său.

Unele virusuri se multiplică relativ puţin în organismul receptiv şi, pentru a obţine cantităţi mai însemnate de material virulent, se recurge la unele artificii experimentale. Citäm, în această direcţie, virusul variolei ovine care injectat pe cale sbcutanată la oaie în doză de 800—1 000 ml dintr-o diluţie de 1 : 100 limfă, dă o pustulă întinsă care conţine o mare cantitate de virus, în timp ce, dacă se injectează aceeaşi cantitate de limfă, însă nediluată, se obţine o reacţie redusă, cu o cantitate mică de virus. În acelaşi scop, M. Bardach (1946) injectează virusul febrei aftoase la cobaii purtători de tumori (liposarcoame grefabile). Virusul se localizează în tumoare, se multiplică în ţesutul neoplazic, şi prin sacrificarea cobaiului şi recoltarea aseptică a tumorii se obţin cantităţi însemnate de virusul febrei aftoase.

Progrese însemnate, în obţinerea unor cantităţi importante de material virulent, s-au obţinut însă prin cultivarea virusului în afara mediului lor natural.

CULTIVAREA VIRUSURILOR ÎN AFARA MEDIULUI LOR NATURAL. ADICĂ ÎN AFARA ORGANISMULUI GAZDEI NATURALE

A cultiva un virus în afara condiţiilor sale naturale, adică în afara celulelor bacteriei, plantei sau animalului pe care un virus le parazitează în mod obişnuit înseamnă, în primul rînd, a cultiva sau a întreţine în stare vie celule animale sau vegetale pe care virusul le-ar putea parazita şi în care deci s-ar putea multiplica. Aceste condiţii se realizează în culturi de ţesuturi şi în embrioni de găină.

MULTIPLICAREA VIRUSURILOR ÎN CULTURI DE ŢESUTURI

După ce, în 1907, Harrison reuşeşte să obţină o multiplicare a unor ţesuturi in vitro, Carrel (1926) cultivă virusul lui Rous, în culturi de ţesuturi, demonstrînd că virusul se multiplică şi se conservă în pasagii succesive. Aceste prime rezultate deschid calea unor cercetări multiple şi vaste, care au rezolvat probleme importante de ordin practic şi teoretic. Cercetările lui Carrel sînt urmate, într-adevăr, în curînd (1928), de cele ale lui Maitland şi Maitland precum şi de cele ale lui Li şi Rivers care simplifică tehnica cultivării virusurilor pe ţesuturi transplantate, astfel că ea poate fi folosită, pe o scară largă, în toate laboratoarele. Gey, în

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 42 — Țesut din cordul embrionului de găină (după **Țaga M.**)
Cultură în picătură suspendată (ob. 3)

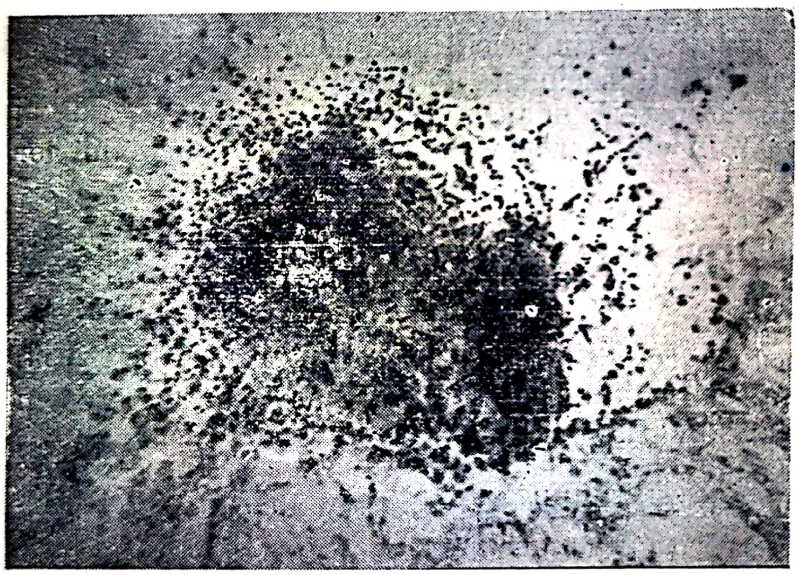


Fig. 43 — Efectul citopatogenic produs de virusul bolii lui Aujeszky asupra culturii din cordul embrionului de găină (ob. 3) (după **Țaga M.**)

1933, introduce în cultivarea celulelor tumorale metoda tuburilor rulante, metodă care a fost aplicată apoi de Enders, Weller și Robins (1949) și apoi și de alți cercetători în cultivarea virusului poliomielitei, descoperindu-se, cu această ocazie, acțiunea destructivă, necrozantă (efectul citopatogenic) pe care virusul poliomielitei și virusurile, în general, o au asupra celulelor pe care se cultivă. Descoperirea antibioticelor cu acțiune bacteriostatică sau bactericidă, ca penicilina și streptomicina, au ușurat mult lucrările privind cultivarea țesuturilor și virusurilor, înlăturînd pericolul invadării culturilor de către bacterii. Recurgîndu-se la antibiotice s-a putut, pe de o parte, folosi ca sursă de celule animale țesuturi deja invadate cu bacterii, cum este de exemplu țesutul amigdalian de la om extirpat în scopuri terapeutice (Barski și col., 1953), iar, pe de altă parte, s-au putut izola prin metode de cultivare in vitro din materiale patologice infectate diverse virusuri.

Metoda, imaginată de Carrel și Fischer, pentru cultivarea țesuturilor și consecutiv a virusurilor necesită următoarele elemente:

1. plasmă sanguină care se recoltează în recipiente sterile și parafinate din carotida de la găină și care servește ca material de sprijin, suport mecanic pentru celule;

2. suc embrionar care se obţine triturînd embrionii de găină în vîrstă de 7—9 zile şi separînd lichidul prin centrifugare; lichidul (sucul) obţinut serveşte ca material nutritiv şi de creştere;

3. fragmente de ţesut viu care, pentru a se impregna cu particulele virulente, sînt ţinute 10 minute în lichidul virulent.

Cultura se face în picătură suspendată, pe lame excavate sau în flacoane Carrel. Ţesutul şi virusul respectiv se multiplică, într-un caz şi în altul, în amestec de plasmă şi suc embrionar.

O metodă mai simplă de cultivare a unor virusuri este aceea imaginată de Maitland şi Maitland (1928) şi care a dat rezultate pozitive, mai cu seamă în cultivarea virusului vaccinal. Ea necesită următoarele elemente: suspensie de celule vii şi un lichid de o compoziţie convenabilă conservării în stare vie a celulelor.

Suspensia de celule vii se prepară din embrionii vii de găină în vîrstă de 8—12 zile. În acest scop, embrionii sînt recoltaţi aseptic, spălaţi de sînge, cu lichidul conservator Tyrode şi apoi trituraţi. Trituratul constituie suspensia celulară.

Pentru conservarea vie a celulelor se folosesc soluţiile Locke, Drew sau Tyrode, dar aceasta din urmă este cea mai frecvent întrebuinţată şi ea are următoarea compoziţie:

Cl Na	8 g
Cl K	0,2 g
Cl_2Ca	0,2 g
Cl_3Mg	0,1 g
PO_4H_2Na	0,5 g
Glucoză	1 g
CO_3Na_2	1 g
Apă distilată	1 000 g

Prepararea soluţiei. Se dizolvă 1 g de glucoză în 250 g de apă distilată şi după dizolvare se adaugă una după alta sărurile de mai sus. O sare nu se adaugă decît după ce precedenta s-a dizolvat. La urmă, se adaugă carbonatul de sodiu şi apoi restul de apă. Lichidul se sterilizează prin filtrare. El trebuie să fie perfect limpede şi să aibă pH = 7,6. Se conservă în recipiente sterile şi poate fi folosit timp de 2 săptămîni după preparare.

Cultivarea virusurilor se face în flacoane Carrel sau Erlenmeyer, cu o capacitate de 30—50 ml. În fiecare flacon se distribuie 3—4 ml de lichid Tyrode şi 0,5—1 ml de suspensie celulară care nu conţine bacterii cultivabile pe medii aerobe sau anaerobe. Se agită flacoanele şi apoi fiecare flacon este însămînţat cu cîteva picături din lichidul virulent care, la fel, nu trebuie să conţină bacterii cultivabile. Flacoanele sînt incubate la 37°C timp de cîteva zile, apoi controlate din punct de vedere al sterilităţii şi al conţinutului în virus. Controlul sterilităţii se face microscopic şi cultural, iar cel al virulenţei prin inoculări în diluţii la animale receptive la virusul însămînţat. Conţinutul flacoanelor găsite bacteriologic sterile şi care conţin virus în cantităţi suficiente poate fi întrebuinţat la prepararea vaccinurilor. În acest fel se prepară, în unele ţări, un vaccin pentru imunizarea omului contra vărsatului.

În metoda Maitland şi Maitland, ca şi în aceea similară, imaginată de Li şi Rivers, se pare că celulele embrionare nu se multi-

plică sau se multiplică într-o mică măsură ; în orice caz, după o incubaţie de cîteva zile toate celulele sînt moarte.

Metoda tuburilor rulante (învîrtite cu o anumită viteză) creează condiţii încă şi mai bune, mai apropiate de cele fiziologice, decît metodele lui Carrel şi cu ajutorul ei se obţin culturi luxuriante de ţesuturi şi de virusuri.

Materialul necesar executării acestei metode (după Barski şi col.). Pentru cultivarea ţesutului sînt necesare trei elemente principale şi anume :

1. plasmă de găină
2. mediu nutritiv
3. ţesut cultivabil.

1. *Plasma de găină* se recoltează cum s-a spus mai sus.
2. *Mediul nutritiv* are următoarea compoziţie :

— Ser placentar uman în proporţie de 20% ; acesta poate lipsi mai ales cînd se transplantează ţesuturi deja adaptate acestui mod de cultivare.

— Ser de cal normal decomplementat (inactivat prin căldură) în proporţie de 15%. Pentru cultivarea ţesuturilor, serul homolog este mai favorabil ca cel heterolog şi de aceea serul de cal trebuie înlocuit cu ser de om, bou, cîine etc. cînd se cultivă ţesuturi provenind de la speciile respective.

— Extract embrionar de găină în proporţie de 15%. Poate fi cu succes înlocuit cu extract embrionar bovin (embrioni de 3 luni sau mai mici) (Gey şi Gey, 1936).

— Ser ultrafiltrat, pentru eliminarea marilor molecule în proporţie de 15%. El poate fi de bou sau de cal şi se prepară după tehnica lui Simms şi Sanders (1942). Taga şi colaboratorii (1955) obţin rezultate cu un ser deproteinizat, prin amestecul cu hidroxid de aluminiu (metoda Georgescu şi col., 1955).

— Soluţia Hanks în proporţie de 35%.

Proporţiile în care se amestecă aceste elemente variază de la o reţetă la alta (Barski şi col., 1953).

Mediului i se adaugă penicilină în proporţii variabile, 200—1 000 U. I. pe 1 ml precum şi streptomicină, — 50—250 γ pe 1 ml.

Soluţia Hanks se prepară astfel :

Soluţia A.

Na Cl	80 g
K Cl	4 g
$MgSO_4$ $7H_2O$	2 g
Cl_2Ca	1,4 g

Se dizolvă succesiv aceste săruri în apă bidistilată şi se completează volumul final la 500 ml. Se autoclavează 10 minute.

Soluţia B.

PO_4Na_2H 12 H_2O	1,5 g sau PO_4Na_2H $2H_2O$ ..... 0,6 g
PO_4KH_2	0,6 g
Glucoză	10,0 g

Se completează volumul la 400 ml cu apă distilată şi se adaugă apoi 100 ml de soluţie, 0,1% roşu de fenol ; totul se sterlizează la autoclavul deschis.

Pentru a obține *soluția concentrată* se amestecă soluțiile A și B, se filtrează prin Seitz și se păstrează la 4°C.

Pentru a obține *soluția finală* se prepară întîi *soluția C:*

CO_3HNa	1,4 g
Apă distilată	100 ml

și apoi se amestecă 1 parte de soluție concentrată și 9 părți de apă bidistilată sterilă și pentru fiecare 100 ml de amestec se adaugă, în momentul folosirii, 2,5 ml de soluție C.

3. *Țesutul cultivabil* poate avea diverse origini, în raport cu virusul care trebuie cultivat. Astfel, Enders și colaboratorii au folosit țesut embrionar uman, Smith și colaboratorii (1950) țesut testicular de om sau maimuță, Barski și colaboratorii (1953) țesut amigdalian. Indiferent de originea sa, el nu poate fi folosit decît scurt timp după recoltare; țesutul amigdalian, de exemplu, păstrat la 4°C, poate fi întrebuințat numai în primele 24 de ore după recoltare.

Tehnica cultivării țesuturilor în tuburi rulante. In tuburi Pyrex de 160×16 mm se pune o cantitate de plasmă, în plasmă se introduc pînă la opt fragmente de țesut cu diametrul de 2—3 mm și apoi se adaugă 1 picătură de mediu nutritiv care coagulează plasma; în acest moment tubul se învîrtește încet, pentru ca plasma în care sînt incluse porțiunile de țesut să se coaguleze pe pereții tubului, constituind un strat continuu. Se adaugă apoi 1 ml de mediu nutritiv, tuburile sînt închise cu dop de cauciuc gri și introduse într-un aparat care permite rularea tuburilor cu o viteză de 6 ture pe oră. Totul se pune la 36°C. In aceste condiții, lichidul nutritiv spală periodic suprafața plasmei coagulate, aducînd țesuturilor elemente nutritive și solubilizînd produșii de dezasimilație. In aceste condiții, celulele, în special fibroblastele, încep să se multiplice, extinzîndu-se pe suprafața plasmei coagulate, unde constituie colonii de celule. Cînd cultivarea a atins proporții convenabile (4—6 zile) se adaugă virusul care pătrunde în celule, se multiplică, putîndu-le produce necroza. Moartea și necroza celulelor survin, în cazul virusului poliomielitei, în 3—4 zile. După această perioadă de timp, în lichidul nutritiv se găsesc cantități importante de virus; identificarea virusului în lichid se face prin metode obișnuite: inoculări la animale, hemoaglutinare.

Metoda tuburilor rulante permite întreținerea și perpetuarea în laborator, în tuburi, a unor țesuturi; tuburile cu țesuturi pe cale de proliferare reprezintă pentru virusuri ceea ce sînt tuburile cu bulion și agar pentru bacterii. In ele se pot cultiva virusurile și prin efectul citopatogenic se poate preciza dacă virusul s-a multiplicat sau nu. Metoda poate servi și pentru tipizarea unor virusuri, folosindu-se constatarea că serul imun specific inhibă efectul citopatogenic.

CULTIVAREA PE EMBRIONI DE GĂINĂ

Cultivarea pe embrioni de găină nu este propriu-zis o cultivare in vitro, ci este o infecție experimentală a unui animal în cursul dezvoltării embrionare. Metoda a fost imaginată și folosită, pentru prima oară, de Woodruff și Goodpasture (1931), care reușesc să cultive virusul diftero-variolei aviare. Procedeul a fost extins repede și aplicat și altor

virusuri. Acest mod de cultivare prezintă o serie de avantaje. Astfel, ouăle de găină pot fi uşor obţinute, incubaţia lor este relativ uşor de realizat, embrionul se dezvoltă repede, este sensibil şi poate, în consecinţă, cultiva o serie de virusuri cum sînt virusul diftero-variolei, virusul pestei aviare şi chiar pe acelea pentru care animalul adult este, în general, refractar, cum sînt virusul gripal, virusul bolii lui Aujesky, virusul vaccinal, virusul jigodiei etc.

Unii cercetători, recurgînd la un artificiu experimental, au putut cultiva şi alte virusuri umane. Ei au observat, în primul rînd, că fragmente de ţesut (placentă sau piele prepuţială) depuse pe membrana corioalantoidiană se menţin vii timp destul de lung. Însămînţînd, pe aceste fragmente, virusuri patogene pentru om cum sînt virusul herpesului sau virusul vaccinal, ei au observat că aceste virusuri se multiplică şi produc incluzii caracteristice în celulele ţesutului grefat.

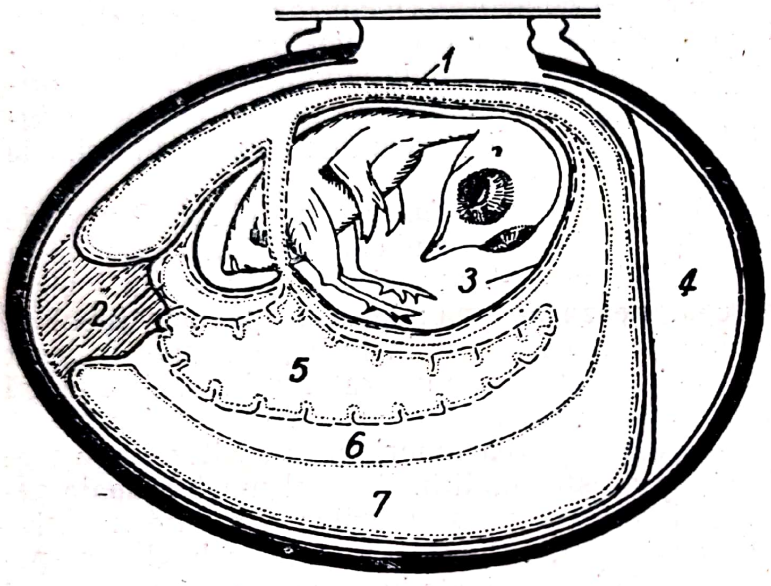
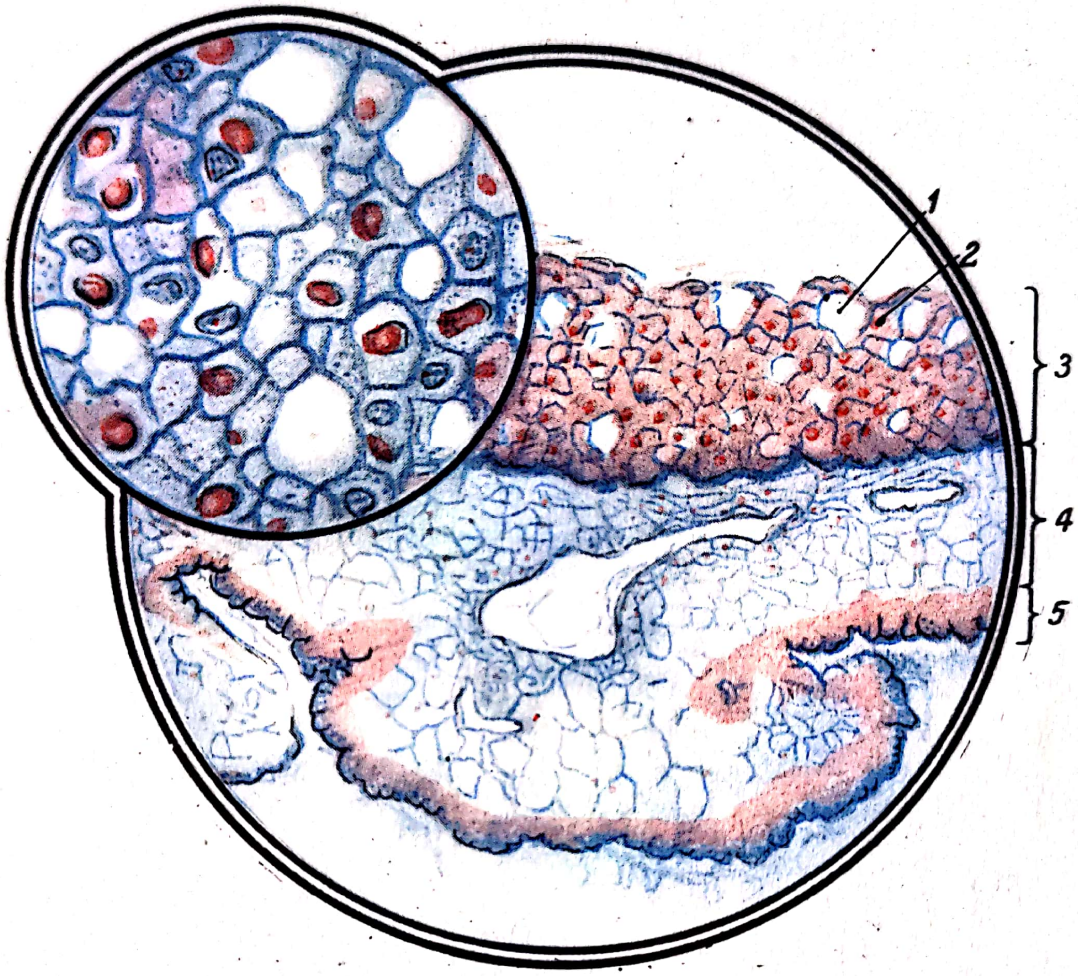


Fig. 44 — Schema embrionului de găină în a 11-a zi de incubaţie

1 — corioalantoidă; 2 — albuş; 3 — amnios; 4 — cameră cu aer; 5 — sac vitelin; 6 — cavitate extraembrionară; 7 — alantoidă

Metoda cultivării virusurilor pe embrionii de găină se aplică în scopuri practice, în special pentru cultivarea virusului pestei aviare şi virusului gripei umane. Tehnica curent folosită în laboratoare pentru însămînţarea virusului pe membrana corioalantoidiană este următearea (tehnica Burnet) :

Ouă proaspete de găină, avînd şalazele intacte, se pun la incubat în incubatoare electrice şi prevăzute cu regulatoare automate de temperatură. După o incubaţie de 4—5 zile, se elimină ouăle infecunde, adică cele în care embrionul nu a început să se dezvolte (ouăle limpezi). Ouăle cu embrionii vii, în vîrstă de 5—15 zile (pentru unele virusuri se folosesc embrioni foarte tineri, pentru altele embrioni mai în vîrstă), se însămînţează cu material virulent, bacteriologic steril. În acest scop, într-un prim timp se mirează oul şi se înseamnă cu un creion poziţia embrionului şi a camerei cu aer, apoi se badijonează coaja oului, în cele două puncte notate, cu tinctură de iod şi se subţiază coaja, în aceleaşi puncte, cu o freză dentistică. Apoi, în dreptul camerei cu aer, se face o gaură, prin coajă, cu un ac bont, iar în dreptul embrionului se face o gaură asemănătoare sau o ferestruică triunghiulară cu laturile de 5—6 mm. Se ridică apoi coaja triunghiului, dar se lasă intactă membrana cochilieră. Cu o pompă de cauciuc se absoarbe, prin gaura făcută, aerul din camera cu aer, ceea ce are drept consecinţă dezlipirea membranei corioalantoidiene de membrana cochilieră. Se creează astfel



Membrana corioalantoidiană a embrionului de găină infectată cu virusul diftero-variolei

Incluzii în celulele epiteliale ale ectodermului
1 — descuamarea balonizantă a celulelor;
2— incluzii; *3*— ectoderm; *4*— mezoderm;
5 — endoderm

Scanned with OKEN Scanner

un spaţiu între cele două membrane. Cu acul de seringă se străpunge acum membrana cochilieră şi se introduce, în spaţiul creat, materialul virulent care se împrăştie singur pe membrana corioalantoidiană. Virusul se depune deci pe suprafaţa acestei membrane, fără a o leziona. În acelaşi fel se procedează şi în cazul cînd în loc de ferestruică s-a făcut o gaură cu un ac bont. După însămînţare, găurile se acoperă cu parafină lichefiată şi oul este pus la incubator.

Unele virusuri, cum este virusul pseudopestei aviare, pot fi introduse în gălbenuş (însămînţare intravitelină). Acest procedeu este mult mai expeditiv. Se marchează poziţia camerei cu aer şi poziţia embrionului, se badijonează coaja din dreptul camerei cu aer cu tinctură de iod, se subţiază această coajă şi apoi cu un ac lung se străpunge coaja introducînd materialul în gălbenuş, adică în zona opusă locului unde se găseşte embrionul. Ouăle însămînţate sînt puse la incubator şi în intervalul de 24—48 de ore aproape totalitatea embrionilor infectaţi mor de infecţia pestoasă în cazul cînd infecţia s-a făcut cu acest virus. În cazul cînd infecţia s-a făcut cu alt virus, embrionii pot muri mai tîrziu sau este necesar ca ei să fie sacrificaţi, prin deschiderea oului, după o durată de incubaţie variabilă. Recoltarea materialului virulent din ouăle infectate se face după toate regulile generale de asepsie. Oul, în dreptul unde se găseşte embrionul, se pensulează cu tinctură de iod, se scoate apoi cu un foarfece un capac oval de coajă, lichidul alantoamniotic se recoltează cu o pipetă, împreună sau separat lichidul alantoidian de cel amniotic, iar embrionul şi membranele corioalantoidiene se scot cu o pensă sterilă şi se pun într-un vas de sticlă steril. Embrionii, precum şi lichidele alantoamniotice, conţin cantităţi importante de virus. Determinarea conţinutului în virus a materialului recoltat se poate face prin inoculări la embrioni sau la animale adulte sau prin reacţia hemoaglutinării.

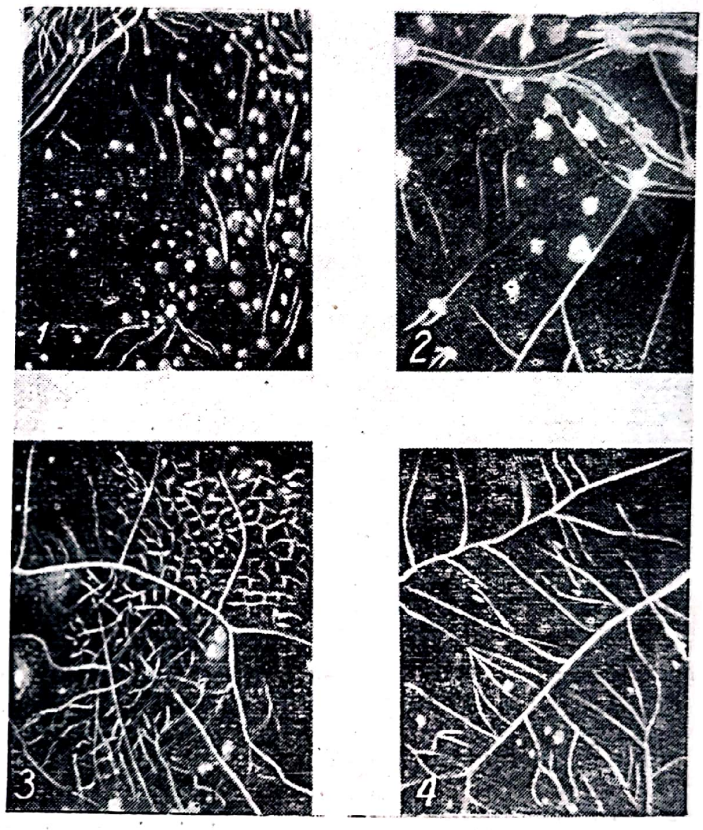


Fig. 45 — Leziuni pe membrana corioalantoidiană a embrionului de găină (după **Doerr şi Hallauer**)
1 — virusul sarcomului Rous, 2 — virusul canarilor Kikuth; 3 — virusul influenţei umane; 4 — virusul de Loupingill

S-au imaginat şi s-au descris în literatură şi alte procedee de însămînţare a embrionului, dar toate, principial, nu diferă prea mult de cele descrise mai sus.

Virusurile care se multiplică în ouăle incubate produc leziuni ale embrionului şi, de cele mai multe ori, moartea acestuia.

Scanned with OKEN Scanner

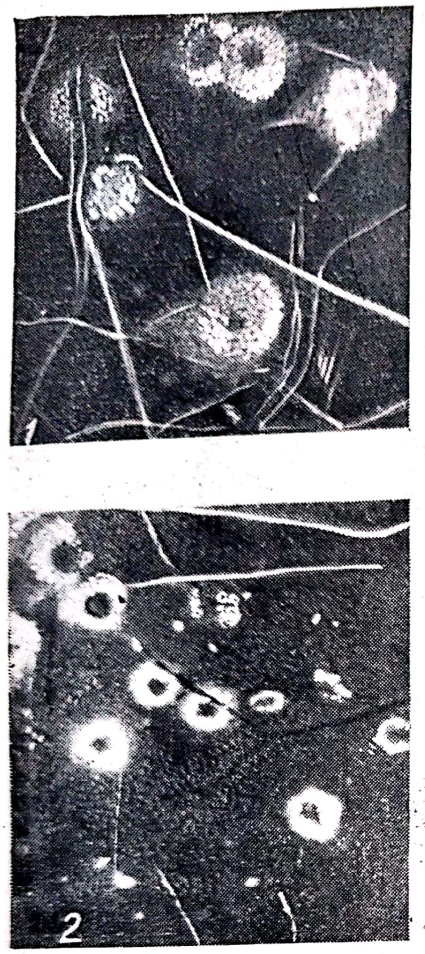


Fig. 46 — Leziuni pe membrana corioalantoidiană a embrionului de găină (după **Doerr** și **Hallauer**)
1 — virusul laringotraheitei; 2 — virusul vaccinal (neurovaccin)

Moartea survine după un interval de timp variabil de la un virus la altul. De exemplu, embrionii infectați cu virusul jigodiei mor între 18 și 120 de ore, iar cei cu virusul difterovariolei după 4—6 zile etc.

Leziunile embrionului diferă de la un virus la altul. Astfel, virusul pestei aviare produce leziuni de tip hemoragic, situate pe tegument, în special, în zona occipitală a embrionului. Virusul diftero-variolei aviare și virusul vaccinal produc leziuni de tip proliferativ — nodular — pe învelișurile embrionului. Virusul jigodiei carnasierelor produce, după C e r k a s k i, hiperemia întregului embrion, precum și hemoragii de diferite dimensiuni, situate în special pe cap. Același virus dă naștere, uneori, pe membrana corioalantoidiană, la niște formații nodulare de tip proliferativ, având dimensiunile unui bob de mei.

Virusul nu este în mod egal răspîndit în embrion, lichide, învelitori și vitelus. În cazul virusurilor vaccinal și al difteriei, ele se găsesc, în cea mai mare concentrație, în leziunile nodulare din membrana corioalantoidiană și lipsesc sau sînt în mică concentrație în embrion ; virusul jigodiei se găsește în embrioni, în învelitori ca și în lichidele amniotic și alantoidian, dar lipsește sau se găsește în mică cantitate în vitelus.

Pentru virusurile care sînt puțin patogene și nu produc moartea embrionului s-au recomandat, în vederea stabilirii prezenței virusului și concentrației sale, metode chimice — precipitare cu acid tricloracetic — sau metode fizice. Astfel, K o c h, S a n d o r și colaboratorii (1950) folosind refractometria găsesc diferențe, în ceea ce privește concentrația proteinelor, între lichidul alantoamniotic al embrionilor normali și infectați. În general, indicele refractometric al lichidelor puilor infectați cu virusul gripal este mai ridicat ca al puilor normali (19,25 la 10 zile și 19,75 la 14 zile).

Folosirea unuia sau altuia din procedeele descrise mai sus au permis cultivarea unui număr important de virusuri animale cum sînt : virusul pestei aviare, virusul vaccinal, virusul diftero-variolei aviare, virusul ectimei contagioase a oilor, virusul gripei umane, virusul jigodiei carnasierilor etc., dar nu a tuturor virusurilor. Într-adevăr, unele virusuri, cum sînt cel al variolei ovine, al pestei porcine etc. nu au putut fi încă cultivate în condiții de laborator.

Amintim că S i l b e r și școala sa, precum și alți cercetători sovietici au obținut rezultate pozitive în încercările lor de a cultiva virusurile pe

bacterii, levuri sau protozoare. Astfel, Silber şi Vostruhova (1932—1933) au obţinut numeroase pasagii (10—40) cu virus vaccinal în culturi de *Torula kefir*. Rezultatele au fost confirmate de numeroşi cercetători. Culturile de *T. kefir* însămînţate împreună cu virusul vaccinal produceau la iepuri şi cobai leziuni caracteristice în care se găseau corpusculi elementari. Mai mult încă, animalele inoculate cu asemenea culturi deveneau imune faţă de virusul vaccinal. Rezultate pozitive s-au obţinut cu virusul rujeolei, virusul rabic, virusul poliomielitei şi chiar cu *Rickettsia prowazeki*. Silber (1952) a studiat şi urmărit îndeaproape acest fenomen de simbioză căruia el îi dă numele de viroforie (purtarea vieţii). El apropie viroforia de bacteriofagie. Viroforia, după autor, a precedat şi a născut bacteriofagia.

BIOLOGIA VIRUSURILOR

ACȚIUNEA DIVERȘILOR FACTORI DIN MEDIU ASUPRA VIRUSURILOR

Temperatura, gradul de umiditate, concentrația diverselor substanțe chimice pot varia, în limite foarte largi, în mediul ambiant, dar virusurile, ca și alte viețuitoare de altfel nu-și pot menține integritatea structurală și funcțională decît în anumite limite de variații. Aceste limite nu sînt aceleași pentru toate virusurile, ci ele variază de la un virus la altul sau de la un grup de virusuri la altul, așa cum s-a văzut deja cînd s-au cercetat relațiile dintre dimensiunile virusurilor, pe de o parte, și rezistența la căldură sau emanațiile de radiu, pe de altă parte. In cele ce urmează se va examina acțiunea diverșilor factori fizici, chimici și biologici asupra virusurilor.

ACȚIUNEA TEMPERATURII MEDIULUI AMBIANT

Virusurile sînt sensibile la căldură, și în general temperatura de 56—60°C, căldura umedă, le omoară într-un timp relativ scurt, 20—30 de minute. Există însă excepții la această regulă.

Astfel, unele virusuri patogene pentru plante ca și unii bacteriofagi suportă perfect aceste temperaturi. Virusul denumit *Nicotiana virus 1 și 2* ca și *Cucumis virus* rezistă, de exemplu, la temperaturi mai mari de 80°C. Bacteriofagii bacteriilor sporulate rezistă, cînd sînt fixați pe spori, la temperatura de 80—90°C un timp care variază în raport cu rezistența sporilor.

In general, bacteriofagul rezistă la temperatura care distruge bacteria pe care el se cultivă, ceea ce permite, în mod curent, separarea principiului litic de bacterii.

Rezistența la căldură este în funcție, în cadrul aceleiași specii, și de starea fizică în care se găsește virusul, și în această privință s-a constatat, de exemplu, că virusul conținut în limfa vaccinală se distruge repede la 56—60°C, în timp ce același virus, înglobat într-un material uscat, rezistă

Scanned with OKEN Scanner

fără a pierde proprietăţile sale 20 de minute la 90°C şi de-abia la 100°C el pierde, în scurt timp, o parte din activitatea sa infectantă iniţială. Constatări similare au fost făcute şi cu privire la virusul diftero-variolei aviare.

Sensibilitatea la căldură variază de la o specie de virus la alta. Iată, pentru un grup de virusuri, care prezintă o mai mare importanţă pentru patologia animală, care sînt temperaturile care le distrug şi timpul necesar pentru a realiza această distrugere.

Virusul febrei aftoase este omorît în 15—40 de minute la 55°C, în 30 de minute la 65°C şi în 5—10 minute la 70°C.

Virusul variolei ovine rezistă 15—23 de zile la temperaturi variind între 25 şi 37°C. Temperatura de 52—53°C îl distruge în 15 minute, iar cea de 56—58°C, în 3 minute.

Virusul diftero-variolei aviare sub formă uscată este distrus în 5 minute la 100°C, în 30 de minute la 80°C şi 1—3 ore la 60°C. La temperatura de 22°C se conservă cel puţin 30 de zile.

Virusul pestei porcine este distrus, în mod sigur, printr-o încălzire de 60 de minute la 70°C. La temperatura de 37°C, el se conservă timp de 18—20 de zile.

Virusul pestei aviare este sensibil la căldură şi temperatura de 60°C îl distruge în 10 minute.

Virusul bolii lui Aujeszky este distrus printr-o încălzire de 15—20 de minute la 60°C. Uscat în vid, el rezistă 2 minute la 102°C şi chiar la 104°C.

Virusul gastroenteritei pisicilor este distrus în 30 de minute la 56°C. Temperatura de 37°C îl inactivează în 18 ore.

Temperaturile scăzute sînt bine suportate de virusuri şi frigul constituie unul din cele mai curente mijloace de conservare. Virusul febrei aftoase nu este distrus printr-o păstrare de 15 minute la temperatura de —190°C. Ingheţul şi dezgheţul nu modifică activitatea sa patogenă. Virusul pestei porcine se conservă în carnea congelată cel puţin 149 de zile. La temperatura de —70°C toate virusurile îşi păstrează timp îndelungat activitatea.

ACŢIUNEA LUMINII ŞI RAZELOR ULTRAVIOLETE

Lumina solară are o acţiune destructivă asupra virusurilor. Astfel, ea distruge virusul febrei aftoase în 60 de minute, iar virusul pestei porcine în 5—9 ore.

Acţiunea virulicidă a razelor solare prezintă o deosebită importanţă din punct de vedere al distrugerii virusurilor răspîndite de animalele bolnave în mediul ambiant şi ea a fost îndeaproape studiată pentru unele virusuri. Astfel, s-a constatat că această activitate este în funcţie de sezon, precum şi de natura materialului în care este înglobat virusul. Virusul febrei aftoase, de exemplu, răspîndit în mediul ambiant, se distruge în 3 zile în luna august şi în 67 de zile în timpul iernii. Virusul pestei porcine cînd este răspîndit prin sînge în mediul ambiant este distrus în 28 de zile, răspîndit prin materiile fecale în 8—10 zile, iar prin urină în 6—7 zile. La fel, virusul variolei ovine inclus în crustele variolice rezultate din descuamarea leziunilor cutanate se conservă foarte bine şi mult timp pe lînă şi pe pielea oilor.

Scanned with OKEN Scanner

Lumina solară îşi datoreşte activitatea sa virulicidă radiaţiilor cu o lungime scurtă de undă, în special celor ultraviolete. Acestea din urmă putînd fi produse în laborator prin lămpi cu mercur sau tuburi de hidrogen, acţiunea lor virulicidă a fost, în condiţii experimentale, mai îndeaproape studiată. Astfel, virusul vaccinal este distrus de razele ultraviolete în 45 de minute, virusul diftero-variolei aviare în 20 de minute, virusul rabic fix în 10 minute, virusul rabic de stradă în 5 minute etc. Aceste radiaţii par a avea o acţiune nocivă şi asupra virusului care se găseşte în ţesuturile animale şi anume în straturile superficiale ale ţesuturilor. Astfel, ele pot împiedica dezvoltarea leziunilor vaccinale la un iepure infectat prin introducerea virusului în straturile superficiale ale pielii. Evoluţia leziunilor deja apărute poate fi influenţată printr-un tratament cu raze ultraviolete. Intr-adevăr, se constată, în condiţii experimentale, că papulele vaccinale nu se transformă în vezicopustule dacă animalul este supus unui tratament cu raze ultraviolete. Virusul, situat în straturile profunde ale ţesuturilor animale, nu poate fi influenţat de aceste radiaţii pentru motivul că ele au putere redusă de pătrundere.

Radiaţiile ultraviolete au fost folosite şi pentru transformarea virusurilor în vaccinuri. Unii cercetători observă, în această privinţă, că virusul febrei aftoase, expus timp de cel puţin 75 de secunde acestor radiaţii, pierde capacitatea sa infectantă pentru cobai şi chiar pentru bovine, dar conferă animalelor inoculate o stare de imunitate. La fel se comportă şi virusul vaccinal.

Acţiunea virulicidă a luminii este amplificată în prezenţa unor substanţe fotodinamice. Subladze şi Ananina (1943) au arătat, în această privinţă, că lumina unei lămpi de 100 W distruge, în 15 minute, o suspensie de virus dintr-o soluţie de 1/25 000 albastru de metilen. Suspensia de virus este ţinută la o distanţă de 15 cm de sursa de lumină.

Acţiunea virulicidă a razelor ultraviolete pare a fi rezultatul absorbţiei energiei pe care aceste radiaţii le reprezintă şi modificărilor fizice şi chimice pe care această absorbţie o provoacă în structura particulei virulente.

Intre structura chimică a particulei virulente şi lungimea de undă absorbită există o relaţie şi studiul acestor relaţii poate da indicaţii privind structura chimică a virusului. Asemenea cercetări ca şi acele, de alt fel, privind acţiunea virulicidă a razelor ultraviolete, nu se pot face decît pe produse pure. Produsele impure pot falsifica rezultatele. Impurităţile, într-adevăr, pot proteja virusurile, dar, în acelaşi timp, ele pot absorbi radiaţiile ultraviolete şi suferi modificări care influenţează virusul.

ACŢIUNEA RAZELOR X

Razele X sînt mai puţin active faţă de virusuri filtrabile decît faţă de bacterii şi ele ar putea fi folosite la purificarea virusurilor care se găsesc în materiale infectate cu bacterii. Razele X pot produce modificări ale proprietăţilor de patogenitate a virusurilor şi, pentru acest motiv, ele ar putea fi întrebuinţate şi în transformarea virusurilor în vaccinuri.

Scanned with OKEN Scanner

ACȚIUNEA VIBRAȚIILOR ULTRASONORE

Sunetele și ultrasunetele au un efect nociv asupra materiei vii; organismele monocelulare — bacterii, protozoare — ca și moleculele mari proteice pot fi dezintegrate atunci cînd sunt supuse acțiunii unor vibrații sonore de înaltă frecvență.

Pentru a obține o dezintegrare a materiei vii sînt necesare unde sonore de înaltă frecvență. S-au construit aparate care pot produce unde cu o frecvență de 1 milion de vibrații pe secundă. Amintim că urechea umană percepe numai sunetele cu o vibrație cuprinsă între 16 și 16 000 de ondulații pe secundă.

Virusurile filtrabile, după cercetările făcute pînă în prezent, se comportă neuniform față de energia sonoră: unele virusuri sînt inactivate, altele însă nu suferă nici o modificare.

Virusul mozaicului tutunului, care se prezintă ca niște bastonașe fine și lungi de 300—400 milimicroni, supus alternativ acțiunii unor vibrații sonore cu frecvență de 7 500 și 330 000 de ondulații pe secundă suferă o fragmentare a elementelor virulente. Acestea își micșorează de cîteva ori diametrul longitudinal pierzîndu-și, în același timp, activitatea infectantă. Această din urmă proprietate reapare după un repaus de 15 minute și ea este însoțită de o regrupare parțială a elementelor frînte prin energia sonoră și de reconstituire a elementelor avînd dimensiunile normale.

Unii cercetători observă că virusul vaccinal, supus acțiunii undelor ultrasonore (450 000 de vibrații pe secundă), pierde proprietățile infectante, dar conservă pe cele vaccinante. Inactivarea virusului vaccinal de către oscilațiile acustice se realizează numai în medii lipsite de proteine (produse purificate).

ACȚIUNEA PRESIUNII INALTE

Ultrapresiunea poate distruge activitatea patogenă a virusurilor. Astfel, după C. Levaditi, virusul herpetic este distrus la 3 000 atmosfere, cel al febrei aftoase la 4 000, virusul rabic fix la 5 000, al bolii de Borna la 7 000, bacteriofagul stafilococului la 3 000, al bacilului fînului (*Bacillus subtilis*) la 7 000.

Basset și colaboratorii au arătat că bacteriofagii, care se găsesc în sporii bacteriilor respective, rezistă la presiuni mult mai mari decît cei care se găsesc în formele vegetative. Bacteriofagul bacilului fînului de exemplu rezistă, cînd este fixat pe spori, la 13 500 atmosfere.

ACȚIUNEA SUBSTANȚELOR CHIMICE

Acțiunea nocivă a unor substanțe chimice asupra virusurilor a fost de mult timp constatată. Ea poate fi datorită efectului oxidant, modificărilor de pH sau combinării antisepticului cu unele funcțiuni chimice din compușii care constituie particula virulentă. Substanțele oxidante, cum sînt permanganatul de potasiu și apa oxigenată exercită o puternică acțiune virulicidă. De altfel, chiar oxigenul atmosferic este nociv pentru virusuri și acestea se conservă mai bine în anaerobioză decît în aerobioză. Acțiunea virulicidă a oxigenului atmosferic este accentuată în prezența unor sub-

Scanned with OKEN Scanner

stanțe fotodinamice cum sînt albastrul de metilen, albastrul de tripan, tripaflavina etc., așa cum rezultă, în special, din lucrările lui Levaditi și Nicolau (1922). Substanțele reductoare ca acidul ascorbic, cisteina etc. pot inactiva unele virusuri din cauză că ele duc la o producție de perhidrol (H_2O_2) în mediu. În general, însă, reductorii, spre deosebire de oxidanți, sînt puțin activi față de virusuri.

Acizii și alcalii, modificînd gradul de ionizare a mediului, pot exercita un efect nociv asupra virusurilor care nu-și pot păstra integritatea funcțională decît între anumite limite de pH. Aceste limite variază de la un virus la altul. Astfel, virusul pestei porcine se conservă mai mult timp la pH = 5 — 5,5 decît la pH = 7. Virusul febrei aftoase se conservă, în condiții egale, la trei limite diferite de pH și anume: 3; 7,6 și 11,7. Mediile mult acide, ca și cele mult alcaline, distrug unele virusuri. Alcalii sînt din acest punct de vedere, mai activi decît acizii și de aceea soluțiile de sodă își găsesc o largă aplicare în dezinfecție. Soluțiile de sodă 2% omoară, de exemplu, virusul febrei aftoase în 5—10 secunde.

Formolul este, pentru unele virusuri, un virulicid activ. Astfel, o diluție de 0,2% distruge virusul lui Aujeszky în 5 zile, dar nu în 48 de ore (C. Petrovici); o soluție de 0,1% omoară virusul pestei aviare în 24—48 de ore, iar pe cel al variolei ovine într-o oră. Formolul își datorește activitatea sa virulicidă cuplării sale cu funcțiunile SH, NH_2 și NH din moleculele particulei virulente. Virusurile patogene pentru animale se pare că sînt iremediabil inactivate prin formol; cele patogene pentru plante, deși se inactivează și ele prin formol, se pot reactiva în anumite condiții experimentale. Astfel, unii cercetători reactivează virusul mozaicului tutunului inactivat cu formol, prin histidină sau dializă la pH = 3.

Lizolul este unul din cei mai puternici virulicizi și în concentrații de 5% el inactivează toate virusurile în 1—5 minute.

Fenolul este puțin activ față de virusuri. Astfel, virusul pestei porcine, sub formă de sînge virulent, glicerinat 1% și fenolat 0,5%, se conservă la ghețar timp de 18 luni. Virusul diftero-variolei aviare este distrus în 90 de minute într-o soluție 1% fenol. Aceeași diluție nu omoară, la temperatura de 37°C, virusul pestei aviare decît într-o lună. Virusul variolei ovine se distruge în 48 de ore într-o soluție de 0,5% fenol. Virusul febrei aftoase rezistă timp îndelungat într-o soluție 1% de fenol.

Sublimatul are o acțiune inegală față de diversele virusuri. Astfel, virusul febrei aftoase nu se distruge decît în 6 ore într-o soluție de 0,1%, în timp ce virusul variolei ovine este omorît, de aceeași diluție, în 15 minute.

Glicerina, deși este bactericidă pentru formele vegetative ale multor bacterii, este inactivă față de virusuri și de aceea ea constituie pentru ele un lichid conservator.

Solvenții organici ca alcoolul etilic, alcoolul metilic, acetona și în special eterul au acțiuni diferite asupra virusurilor și anume pe unele le inactivează, dar față de altele nu au nici o acțiune nocivă. Acest mod de comportare a permis folosirea solvenților organici pentru separarea virusurilor care se găsesc în amestec într-un material patologic.

Virusul febrei aftoase, de exemplu, nu este distrus la o concentrație de 75% alcool etilic, iar virusul poliomielitei umane la o concentrație de 25% alcool etilic. Față de eter (concentrații de 10—40%) sînt sensibile următoarele virusuri: virusul gripei A și B, virusul oreionului, virusul

pestei aviare, virusul pseudopestei aviare, virusul sarcomului lui Rous, virusul coriomeningitei limfocitare etc., şi sînt rezistente următoarele: virusul vaccinal, virusul variolei ovine, virusul rabic, virusul febrei aftoase, virusul papilomului iepurelui, unele tulpini de bacteriofag stafilococic. Concentraţia eterului nu influenţează sensibilitatea sau rezistenţa unui virus în sensul că un virus sensibil este distrus de concentraţii reduse (10%), iar unul rezistent nu este distrus de concentraţii mari (40%). Bacteriofagii nu se inactivează printr-un contact de scurtă durată cu alcoolul sau acetona şi această rezistenţă poate fi folosită pentru separarea lor din culturile bacteriene.

Toluolul este mai activ faţă de bacterii decît faţă de virusul febrei aftoase, ceea ce permite înlăturarea bacteriilor din materiale infectate.

Soluţiile saline se comportă diferit faţă de virusuri. Virusul encefalomielitei cailor este distrus în cîteva ore chiar în soluţiile fiziologice, iar virusul papilomului iepurelui rezistă mult timp în soluţii 2% de sare, virusul lui Aujeszky, la fel, în soluţii 2,5%.

ACŢIUNEA UNOR FACTORI BIOLOGICI

Fermenţii proteolitici sînd de regulă, puţin activi faţă de virusuri, ceea ce explică, pe de o parte, posibilitatea infecţiilor digestive iar, pe de altă parte, rezistenţa lor în celula vie.

Pepsina, tripsina, papaina nu hidrolizează sau hidrolizează foarte încet virusul vaccinal, ceea ce a permis separarea corpusculilor elementari de materiile proteice cu care ei se găseau în amestec în produsul virulent (cruste). Tripsina este inactivă pentru bacteriofag ca şi pentru virusurile mozaicului tutunului şi gripei purceilor. În schimb, virusul encefalomielitei cailor este inactivat prin tripsină chimic pură şi cristalizată.

Procesele de putrefacţie nu alterează, de regulă, virusurile care, în consecinţă, pot fi izolate, prin metode potrivite, din materiale putrefiate.

Antibiotice. Pînă în prezent nu s-au izolat substanţe similare cu penicilina, streptomicina etc., şi care să aibă acţiune virulostatică sau virulicidă, in vivo. În consecinţă, virozele animale sau umane nu se pot trata încă prin antibiotice, aşa cum se tratează infecţiile bacteriene. Semnalăm totuşi că Waksman şi colaboratorii au izolat din *Streptomyces levandulae* un produs numit „Erlichina" care poate opri, de exemplu, dezvoltarea infecţiei cu virusul pseudopestei aviare sau cu virusul gripei la embrionii de găină. In vitro, unele extrase obţinute din bacterii, plante sau animale au însă o acţiune neutralizantă asupra virusurilor. Astfel, subtilina extrasă din *Bacillus subtilis*, mezenterina din *B. mesentericus* (D. Ionescu şi Stamatescu, 1948) neutralizează virusul rabic in vitro şi amestecul (extras bacterian plus virus rabic) nu produce turbarea la animalele receptive. Extrasele obţinute din speciile de plante *Agave americana* şi *A. atenuata* neutralizează, la fel, virusul rabic in vitro. Unele lichide animale, cum este limfa viermilor, veninul de viperă etc. au fost găsite, la fel, capabile să neutralizeze virusul rabic. Acţiunea neutralizantă a acestor diverse lichide pare a fi datorită conţinutului lor în fermenţi proteolitici. Ele sînt inactive in vivo şi, în consecinţă, nu dau rezultate în prevenirea şi tratarea virozelor respective.

CONSERVAREA VIRUSURILOR

Virusurile sînt parazite ale celulei animale, vegetale sau bacteriene şi ele se multiplică în condiţiile în care trăiesc celulele respective. Virusurile patogene pentru animale cu sînge cald, de exemplu, se multiplică la temperaturi vecine cu ale corpului acestor animale. Bacteriofagul, virus parazit al bacteriilor, încetează să se dezvolte la temperaturi la care diviziunea bacteriilor nu mai este posibilă. Scos din mediul său natural de multiplicare, adică din celula vie şi receptivă, virusul trece într-un stadiu de materie inertă, în care orice activitate fiziologică încetează. Virusul, în afara celulei vii, aşa cum afirmă Suhov, este lipsit de orice activitate vitală. Pus în condiţii favorabile, materia sa capătă proprietăţile vieţii şi începe să se multiplice. La această scară dimensională, procesul vieţii este deci reversibil (Suhov).

Factorii care condiţionează multiplicarea virusurilor se suprapun cu acei necesari multiplicării şi conservării vieţii celulei gazde, deci anumită temperatură, anumit pH, anumită concentraţie a principiilor nutritive etc.

CONSERVAREA LA TEMPERATURI SCĂZUTE

Temperaturile optime de multiplicare pentru un virus nu sînt însă şi temperaturile optime de conservare. Virusurile parazite ale animalelor homeoterme se distrug repede la temperatura de 37°C, dar se conservă cu atît mai bine şi mai mult timp cu cît temperatura este mai scăzută.

Unele virusuri se conservă în lichidele patologice naturale şi neinfectate cu bacterii un timp îndelungat. Limfa variolică ovină, recoltată aseptic din pustule şi păstrată în fiole închise la flacără, la temperatura de 4—8°C, îşi păstrează virulenţa timp de 2—3 ani. Filtratul culturilor lizate printr-un bacteriofag îşi conservă activitatea litică timp de cîţiva ani, pînă la 9 ani, chiar dacă fiolele sînt ţinute, în tot acest timp, la temperatura camerei. Virusul pestei aviare conţinut în diverse lichide patologice se conservă în fiole închise, la flacără şi la gheţar, pînă la 18 luni. Unele virusuri se distrug repede la temperaturi cuprinse între 4 şi 8°C şi, pentru a li se prelungi viabilitatea, sînt îngheţate şi conservate sub această formă. Lichidele virulente se îngheaţă ca atare, ţesuturile virulente se taie în bucăţi mici, se pun în tuburi, se acoperă cu ser fiziologic, tuburile se astupă cu dopuri sau se închid la flacără şi apoi conţinutul lor este îngheţat. Îngheţarea se poate face la temperaturi variabile, dar cele cuprinse între —10 şi —20°C dau, se pare, cele mai bune rezultate. Unii cercetători afirmă că se obţin rezultate tot aşa de bune printr-o îngheţare la —80°C. Virusul rabic fix îngheţat la —20°C îşi păstrează activitatea patogenă timp de 883 de zile. Virusul jigodiei îngheţat la —10°C se păstrează pînă la 1 an, iar virusul pestei porcine îngheţat la — 12°C pînă la $3^1/_2$ luni. Într-o splină îngheţată la —15°C şi păstrată la această temperatură, virusul lui Aujeszky a fost viu chiar după 160 de zile.

CONSERVARE PRIN USCARE

Virusurile uscate se conservă mai bine ca cele care se găsesc în stare umedă. Uscarea se face în cele mai variate feluri, dar, în nici un caz, ea nu se poate face la temperaturi care ar putea inactiva virusul.

Scanned with OKEN Scanner

Unii autori recomandă uscarea în vid, sub clopot de sticlă, într-o atmosferă dezhidratată prin Cl_2Ca. În acest scop, materialul virulent (triturat de organe sau lichide patologice) este pus în strat subțire, în plăci Petri. Uscarea, în condițiile descrise, se face cel mult într-o $^1/_2$ de oră. Vidul este menținut, după uscare, încă cîteva ore. Apoi materialul uscat se raclează cu un bisturiu steril și produsul obținut se pune în fiole care se închid la flacără și se păstrează apoi la temperatura de 4°C. Unele virusuri se raclează greu de pe fundul plăcilor și, pentru a evita pierderile, materialul virulent este pus în plăci care au pe fund o foaie de hîrtie de filtru tăiată după dimensiunile și forma plăcii.

După uscarea materialului virulent, hîrtia de filtru se ridică, se taie în porțiuni mici și se păstrează, în aceleași condiții ca și produsul uscat, pe fundul plăcii. Uscarea pe hîrtie de filtru este mai favorabilă conservării virusului rabic fix decît uscarea pe fundul plăcii. Se constată că, în primul caz, virusul se conservă pînă la 394 de zile, iar în al doilea caz, 650 de zile.

Uscarea a fost folosită, cu bune rezultate, și în conservarea altor virusuri filtrabile. Astfel, virusul pestei porcine se conservă la rece, sub formă de pulbere, timp de 36 de luni, dar nu 57 de luni; virusul difterovariolei aviare 18 luni, virusul lui Aujeszky 977 de zile, virusul encefalomielitei americane 533 de zile. Virusul pestei aviare însă suportă greu uscarea și, transformat în pulbere, el se distruge în 8—10 zile. Virusurile sub formă uscată se conservă mai bine la rece decît la cald. Astfel, virusul lui Aujeszky uscat moare în 8 zile la 25—37°C, dar rezistă 50—150 de zile la temperatura camerei.

CONSERVAREA PRIN ÎNGHEȚ ȘI DESICARE ÎN VID (LIOFILIZAREA)

Metoda înghețului și desicării în vid permite o conservare practic nelimitată a unor virusuri greu de păstrat. În acest scop se folosește un liofilizator care permite înghețarea materialului la o temperatură joasă de —10 pînă la —80°C și apoi uscarea lui în vid. Materialul virulent poate fi uscat ca atare, dar se obțin rezultate și mai bune dacă el se amestecă, în prealabil, cu o substanță gumoasă sau cu ser normal de cîine sau de cal. Unii autori au obținut, pentru o serie de virusuri, patogene pentru animale, durate de conservare foarte lungi, așa cum se vede în tabelul 33.

Tabelul 33

Durata conservării unor virusuri prin îngheț și desicare în vid

Specia de virus	Ca atare	Cu substanță gumoasă	Cu ser normal
	Durata conservării în luni		
Virusul jigodiei	7	16	16
Virusul febrei aftoase	12	52	85
Virusul difterovariolei aviare	70	—	—
Virusul pestei porcine (sînge virulent)	84	—	—

Este de remarcat că virusul jigodiei se distruge la temperaturi cuprinse între —4 şi —1°C în cel mult 2 săptămîni, dar se conservă prin acest procedeu, timp de mai bine de 1 an, mai ales dacă este înglobat într-o substanţă conservatoare.

CONSERVAREA PRIN SUBSTANŢE CHIMICE

Unele substanţe chimice, prin aceea că sînt nocive pentru bacterii, dar nu pentru virusuri, pot fi folosite la conservarea acestora din urmă. Acţiunea lor conservatoare se datoreşte, probabil, multor factori, dintre care împiedicarea putrefacţiei bacteriene este cel mai important. Substanţa cea mai frecvent folosită, în acest scop, este glicerina. Ea este nu numai un lichid conservator, dar, în acelaşi timp, prin acţiunea ei bactericidă, purifică virusurile conţinute de materialele infectate.

Astfel, virusul variolic vaccinal se recoltează de pe pielea viţeilor şi, în consecinţă, el conţine în momentul recoltării o bogată floră bacteriană. Materialul, în vederea distrugerii acestei microflore, este pus în glicerină, asigurîndu-se astfel conservarea şi purificarea virusului.

Glicerina asigură unor virusuri o conservabilitate de lungă durată. Astfel, virusul rabic de stradă se conservă, în porţiunile de creier puse în glicerină, pînă la 300 de zile, virusul diftero-variolei aviare pînă la 6 luni, virusul lui Aujeszky pînă la 130 de zile. Virusul pestei porcine se conservă pînă la 5 ani în organe puse în glicerină şi ţinute la temperatura de —15°C.

Pentru alte virusuri, glicerina este un conservant de o valoare mai redusă. Astfel, limfa variolică ovină amestecată cu glicerină în proporţie de $^1/_3$ îşi conservă capacitatea infectantă cel mult 1 lună, iar virusul rabic fix se distruge după o conservare de 15—30 de zile în acest lichid.

Glicerina, în scop conservativ, poate fi folosită în stare pură, dar soluţiile tamponate şi diluate cu apă în proporţie de 50% dau rezultate mai bune. Ele întăresc mai puţin ţesuturile şi, aciditatea lor fiind neutralizată prin substanţe tampon, conservă virusurile mai mult timp.

Soluţiile conservatoare, avînd ca bază glicerina, sînt preparate astfel:

1. *Soluţie preparată cu o glicerină puţin acidă*

Soluţie de difosfat de sodiu 358,24 g difosfat de sodiu chimic pur ($PO_4Na_2+12\ H_2O$) în 1 000 ml apă]	17,5 ml
Soluţie de monofosfat de potasiu (136,16 g în 1 000 ml apă distilată) .	7,5 ml
Apă distilată	475 ml
Glicerină	300 ml

2. *Soluţie preparată cu o glicerină foarte acidă*

Soluţie de difosfat de sodiu preparată ca mai sus	40 ml
Soluţie de monofosfat de potasiu preparată ca mai sus	10 ml
Apă distilată	450 ml
Glicerină	500 ml

Soluţiile se distribuie în fiole şi se sterilizează la autoclav.

Soluţiile saturate de sare pot fi folosite pentru conservarea unor virusuri. Astfel, virusul febrei aftoase se conservă în soluţii de sare, 20—26%, şi cu puţin albuş de ou, pînă la 233 de zile. Virusul pestei porcine rezistă

la acţiunea sării pînă la 226 de zile. Bugeac şi Isopescu (1941) constată că virusul lui Aujeszky se păstrează 133 pînă la 136 de zile în soluţie de 25% sare, la pH = 5,9 — 6,0 şi la temperatura de 2 — 4°C.

In soluţii de 10 şi 21% sare, el se conservă 50 de zile, tot la gheţar şi la un pH = 6,3. La temperatura camerei, în soluţii de 20% sare, virusul se conservă 15—30 de zile.

CONSERVAREA VIRUSURILOR IN NATURĂ, IN AFARA ORGANISMULUI PARAZITAT

Durata conservării virusurilor în mediul ambiant interesează îndeaproape profilaxia bolilor pe care aceşti microbi le provoacă. Intr-adevăr, măsurile de dezinfecţie, de carantină a unui local sau teren infectat cu un virus depind de durata rezistenţei agentului patogen în mediul ambiant. Această rezistenţă variază în raport cu numeroşi factori ca : specia virusului, materialul în care el se găseşte înglobat, temperatura şi luminiscenţa mediului exterior etc. Unele virusuri sînt mai rezistente ca altele. Virusul pestei porcine rezistă mai mult în mediul ambiant ca cel al jigodiei. Pentru aceeaşi specie, rezistenţa variază în raport cu materialul în care se găseşte virusul. Virusul pestei porcine, de exemplu, eliminat prin sînge, rezistă mai mult ca cel eliminat cu materiile fecale sau cu urina.

Rezistenţa variază, la fel, în raport cu temperatura mediului ambiant şi cu intensitatea luminii care acţionează asupra virusului. Am văzut, în acest sens, că virusul febrei aftoase se distruge mai repede vara, cînd temperatura este ridicată şi zilele sînt luminoase şi mari, decît iarna cînd temperatura este scăzută şi zilele mai puţin însorite şi scurte. Temperatura mediului ambiant este prin ea însăşi un factor nociv pentru virusuri. In plus, nocivitatea ei se măreşte prin aceea că ea înlesneşte dezvoltarea proceselor de putrefacţie bacteriană care la fel pot distruge unele specii de virusuri.

PROPRIETĂŢILE BIOLOGICE GENERALE ALE VIRUSURILOR

ADSORBŢIA VIRUSURILOR DE CĂTRE DIVERSE PARTICULE

Virusurile pot fi adsorbite de unele particule inerte ca hidroxidul de aluminiu, cărbunele animal, caolinul etc., precum şi de unele celule animale — hematii — sau vegetale — bacterii. Virusurile se comportă, din acest punct de vedere, ca proteinele, fermenţii, toxinele bacteriene etc.

Numeroase specii de virus au putut fi adsorbite. Astfel, Levaditi şi Nicolau (1923) fixează virusul conţinut în 5 ml de emulsie vaccinală pe 4 g de cărbune animal. Gildemeister şi Herzberg (1924) adsorb bacteriofagul dintr-un filtrat pe pămînt de infuzori, Nicolau şi Gallovay (1930) pe cel al maladiei de Borna, pe caolină sau cărbune animal, Schmidt (1936) virusul febrei aftoase pe hidroxid de aluminiu, N. Stamatin (1937) virusul variolei ovine pe cărbune animal, Bawden (1921) virusul herpesului pe colibaicli, Silber şi Beliaeva (1925), Turevici şi Ianusievici (1937) virusul vaccinal pe levuri (*Torula kefir*), Serghie şi colaboratorii (1945) virusul gripei şi virusul rujeolei, pe bacilii tifosului, Zeitlenc (1950) virusul ectromeliei şoarecilor pe stafilococi şi sarcine, Weinberg (1951) virusul rabic pe

bacilii tifosului, Takatsky, virusul gripei pe globule roşii etc. Tovarniţki (1948) constată, mai departe, că virusul gripei se cuplează cu papaina (ferment) în proporţie de 4 la 1 şi constituie împreună un complex precipitabil cu apă şi inactiv din punct de vedere biologic. Fixarea virusului gripei s-a putut face şi pe alţi fermenţi (molecule albuminice), cum este clupeina. Unii cercetători au constatat că virusurile pot fi fixate pe bacterii nu numai în condiţii de laborator, dar chiar şi în condiţii naturale. Virusul vaccinal, de exemplu, a fost găsit în culturile izolate din limfa de viţel.

Hirst (1941) a observat că virusul gripei, conţinut în lichidul amniotic al embrionului de găină, aglutinează atît globulele roşii ale embrionului, cît şi ale păsărilor adulte şi că această aglutinare se datoreşte adsorbţiei virusului pe respectivele globule. Cercetările ulterioare au dovedit că o serie de virusuri ca virusul pestei aviare, virusul pseudopestei aviare şi virusul jigodiei ciinilor (Vladimirov, 1949) pot fi adsorbite pe globule roşii de găină. Alte virusuri însă nu sînt adsorbite pe hematii. Vynohradnyk (1949), de exemplu, obţine rezultate negative cu virusul pestei porcine.

Adsorbţia unui virus, pe un substrat oarecare, este condiţionată de o serie de factori fizici. Se constată, în acest sens, că virusul febrei aftoase este adsorbit de cărbunele animal la orice pH, dar că hidroxidul de aluminiu (electropozitiv) îl fixează mai bine în mediul alcalin, iar caolinul (electronegativ) în mediul neutru. Virusul variolei ovine se adsoarbe pe cărbunele animal în mediul acid mai bine ca în mediul alcalin; la fel virusul pestei porcine se fixează mai bine în zona acidă (pH = 5,5) decît în zona alcalină. Virusul vaccinal se adsoarbe pe *Torula kefir* mai bine la pH = 5,8 — 6,2 decît la pH=7,1 — 8,2. Prezenţa electroliţilor este indispensabilă, aşa cum a arătat Oveiarova (1950), fixării bacteriofagului pe germenul sensibil. Autoarea a dovedit, într-adevăr, că stafilococii omorîţi şi eliberaţi de electroliţi prin spălare nu adsorb bacteriofagul dializat. Fixarea se face însă dacă se adaugă electroliţi, clorură de sodiu, clorură de litiu, clorură de calciu sau clorură de magneziu.

Fixarea pe un substrat adsorbant nu este definitivă şi, în anumite condiţii, virusul adsorbit se eluează, adică se desprinde de pe particulă şi trece în lichid. Eluarea este deci fenomenul de desprindere a virusului de pe substratul adsorbant. Unii cercetători constată, în acest sens, că bacteriofagul este adsorbit de pămîntul de infuzori în mediu acid, dar el se eluează prin alcalinizarea mediului.

Deci schimbarea pH-ului duce la desprinderea virusului de pe substratul adsorbant. Mai sînt şi alţi factori care condiţionează fenomenul de adsorbţie şi eluţie. Astfel, eluţia nu este totală în cazul cînd se foloseşte o cantitate mare de substrat adsorbant, deoarece se formează complexe (substrat — virus) ireversibile. Eluarea bacteriofagului de pe *Bacillus megatherium* omorît prin încălzire a putut fi realizată de Pirie (1940) tratînd amestecul cu albuş de ou. Acelaşi autor a mai constatat că bacteriile tratate cu albuş de ou nu mai adsorb bacteriofagul.

Descoperirea fenomenelor de adsorbţie şi eluţie a dus la unele aplicaţii practice privind lămurirea unor probleme legate de biologia acestor vieţuitoare. Astfel de aplicaţii practice sînt purificarea şi concentrarea virusurilor. Tovarniţki (1948) recomandă şi aplică, în scopul purificării şi concentrării virusurilor, procedeul lui Jensen, care constă în precipi-

tarea unei soluții saturate de ghips cu o soluție 30% de alcool etilic. În momentul precipitării, ghipsul, devenit ghips coloidal, antrenează virusul din soluție. Eluția virusului de pe ghipsul coloidal se face fie cu glicerină (lichid care dizolvă ghipsul, dar nu hidratează virusul), fie cu alcool sau soluție de gelatină (lichid care nu dizolvă ghipsul, dar hidratează virusul). Această metodă permite, după Tovarnițki, o purificare a virusului pînă la 80% și concentrarea lui de 200—400 de ori.

Tot Tovarnițki a folosit și realizat purificarea și concentrarea virusurilor cu ajutorul soluțiilor de urat de potasiu. În acest scop se amestecă aceste soluții cu lichidul virulent și amestecul este pus la congelat, unde uraţii precipită, antrenînd virusul. După 24 de ore, amestecul este dezgheţat și prin centrifugare se separă uraţii și deci și virusul de lichid. Eluția virusului se face în soluții tampon cu pH = 7,4 sau 5,5. Acest procedeu elimină proteinele străine din lichidul virulent în proporție de 60—80%, iar virusul este concentrat în proporție de 156—200%, în raport cu concentrația inițială.

Tot ca o aplicație practică este de amintit că mecanismul acțiunii serului imun asupra particulei virulente a putut fi, cel puțin parțial, lămurită, folosindu-se proprietatea virusurilor de a se fixa, în anumite condiții, pe un substrat, și de a se elua de pe el în alte condiții. N. Stamatin, printre alții, constată, astfel, că dintr-un amestec neutru de ser imun plus virusul variolei ovine se poate recupera, prin adsorbție pe cărbune animal, virusul virulent, ceea ce demonstrează că virusul nu este distrus de serul imun.

Cea mai importantă aplicație practică a fenomenului de adsorbție o constituie introducerea, de către Glenny, Schmidt și alții a vaccinurilor adsorbite în profilaxia bolilor virotice. Schmidt, plecînd de la constatarea că toxinele bacteriene adsorbite pot fi suportate de animalele sensibile în doze sigur mortale și că animalele inoculate cu acest fel de amestecuri devin, în urma acestei probe, imune, încearcă activitatea patogenă și vaccinantă a unor virusuri adsorbite. El se adresează, în primul rînd, virusului pestei aviare și constată că acest virus este adsorbit de către hidroxidul de aluminiu și că, sub această formă, el este, uneori, dar nu totdeauna, inofensiv pentru animalele receptive. Animalele care, în urma inoculării virusului adsorbit, nu au făcut o pestă mortală devin imune. Autorul, pentru a transforma virusul adsorbit într-un vaccin inofensiv, îl păstrează 1 săptămînă la 37°C. Amestecul, în aceste condiții, devine complet inofensiv, el păstrîndu-și însă o însemnată valoare vaccinantă. Într-adevăr, găinile injectate cu un asemenea produs rezistă la probe severe de control — injecții intracerebrale cu virus virulent. Lipsa de nocivitate a virusului adsorbit pare a fi datorită faptului că acesta nu se elueză, nu se desprinde de pe particula adsorbantă decît în cantități foarte mici, cantități care pot fi neutralizate de către organism. Cantitățile de virus care trec treptat de la locul de inoculare în organism sînt incapabile să producă infecția, sînt deci în doze subinfecțioase, dar sînt capabile să producă starea de imunitate specifică.

Aceste constatări au permis prepararea unei serii întregi de vaccinuri plecînd de la tulpini virulente de virus. Unele din aceste vaccinuri și-au găsit o largă aplicație practică.

Adsorbția virusurilor și-ar putea găsi aplicații în diagnosticul diverselor viroze. S-a constatat, în acest sens, că bacteriile încărcate cu virus

Scanned with OKEN Scanner

sînt aglutinate de un ser antivirus. Plecînd de la această constatare, A. Serghiev şi colaboratorii (1945) au arătat că această metodă poate fi folosită pentru diagnosticul gripei şi rujeolei la om, Weinberg (1951) pentru diagnosticul turbării, Revo şi Smalii (1951) pentru diagnosticul encefalomielitei cailor.

Reacţia de hemoaglutinare sau reacţia Hirst (Hirst, 1941) este tot o aplicaţie a fenomenului de adsorbţie. Prin reacţia Hirst se descoperă nu numai prezenţa unui virus într-un material patologic, ci se poate stabili şi cantitatea de virus prezent. Cu cît materialul respectiv va aglutina globulele roşii într-o diluţie mai mare, cu atît el va fi mai bogat în virus. Reacţia Hirst se face în tuburi din sticlă neutră, cu fundul bine rotunjit, avînd înălţimea de 7 cm şi diametrul de 0,8 cm. Ca material virulent se poate folosi lichidul alantoamniotic sau un triturat de organe virulente eliberat prin centrifugare de celule şi detritusuri celulare. Pentru a determina conţinutul unui produs în virus, se procedează la diluarea sa de la simplu la dublu ($^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_8$ etc.) în apă fiziologică preparată cu apă bidistilată şi din sare chimic pură. Materialul diluat se repartizează într-o serie de tuburi în cantitate de 1 ml. În fiecare tub se pune apoi cîte 1 ml de globule roşii în diluţie de 2%. Citirea se face după 1 oră, la temperatura camerei, pe baza imaginii de fund care se examinează cu o oglindă. Există totdeauna şi un tub martor.

Globulele roşii de găină sînt cele mai folosite pentru reacţia Hirst şi ele se obţin şi se prepară în felul următor: sîngele se recoltează din vena aripei pe un volum egal de soluţie 2% citrat de sodiu; amestecul se trece prin tifon şi se spală de trei ori cu apă fiziologică. După ultima spălare se adaugă depozitului de globule două volume de apă fiziologică şi amestecul este centrifugat 8 minute la o viteză de 900 de turaţii pe minut. Sedimentul globular este diluat de 50 de ori, obţinîndu-se astfel o suspensie 2% cu 160 000 — 180 000 de globule roşii pe 1 mm^3. Este mai bine ca sedimentul globular să se păstreze la 4°C şi să se dilueze înainte de executarea reacţiei (Hirst, 1942).

TROPISMUL VIRUSURILOR

Se înţelege prin tropism afinitatea specifică a virusurilor pentru anumite ţesuturi sau celule ale organismului. Se ştie, într-adevăr, că virusurile o dată pătrunse în organism nu se fixează la întîmplare pe orice celulă, ci fiecare virus are afinităţi pentru anumite ţesuturi ale organismului speciei receptive.

Privite, din punct de vedere al tropismului lor, virusurile pot fi împărţite în: *pantrope, dermotrope, neurotrope, hemotrope* etc.

Virusurile *pantrope* sau *poliorganotrope* se răspîndesc, în general, cu sîngele şi de aceea le găsim în toate organele; un organ va conţine cantităţi de virus cu atît mai mari cu cît este mai bogat în sînge. În acest fel se comportă şi sînt deci pantrope virusurile pestei porcine, anemiei infecţioase a calului, pestei aviare, pestei bovine, bolii lui Aujeszky, gastroenteritei infecţioase a pisicilor etc.

Alte virusuri lipsesc din sînge, dar se găsesc în ţesuturile pentru care au afinitate şi care le cultivă. Virusul rabic, de exemplu, este *neutrotrop* şi, în cantităţi decelabile, în condiţii experimentale obişnuite, nu-l găsim decît în creier. În vederea descoperirii lui, în organismul unui animal mort, cu

Scanned with OKEN Scanner

suspiciune de turbare, trebuie să ne adresăm acestui țesut, inocularea sîngelui, splinei sau ganglionilor limfatici dînd rezultate negative chiar cînd animalul a murit de turbare.

Alte virusuri sînt *dermotrope,* adică au afinitate pentru piele și ele nu se găsesc decît în leziunile cutanate. Astfel sînt virusurile herpesului, variolei, ectimei contagioase a oilor și într-o mare măsură virusul febrei aftoase etc. Este de remarcat că unele virusuri au afinitate pentru anumite celule dintr-un țesut. Virusul febrei aftoase, de exemplu, se cultivă la bovine pe celulele epiteliului mucoaselor, dar nu pe celulele epiteliale ale pielii. Invers, virusul papilomului lui Shope crește și afectează celulele dermului și nu ale mucoaselor. Unele virusuri, cu afinitate marcantă pentru piele sau mucoase, se cultivă și multiplică și în creier și invers, cele cu afinitate însemnată pentru sistemul nervos au și un oarecare tropism cutanat, ceea ce a făcut pe L e v a d i t i să numească virozele cu afinitate pentru derm și țesutul nervos *neurodermatoze.* Turbarea este după L e v a d i t i o neurodermatoză. La fel, diversele variole. Această afinitate s-ar datori faptului că atît creierul cît și tegumentele au aceeași origine embrionară și anume provin din foița externă.

Afinitatea tisulară a unui virus prezintă o deosebită importanță practică. Ea ne permite să diferențiem virusurile între ele și cunoașterea ei ne arată care este țesutul care trebuie recoltat și inoculat pentru a obține o infecție experimentală, în scop de diagnostic sau cercetare științifică.

Fixarea unui virus pe anumite celule organice și nu pe altele este condiționată în primul rînd de posibilitatea virusului de a pătrunde în celulă și, în al doilea rînd, de capacitatea celulei de a cultiva virusul. Virusul variolei, de exemplu, inoculat pe cale intravenoasă, la o oaie receptivă, va circula în întregul organism, dar, în mod obișnuit, el nu se fixează decît pe celulele dermului, pentru că în acestea poate să pătrundă și să se multiplice. La fel, virusul rabic, inoculat pe cale subcutanată sau intracutanată, nu se fixează în țesutul în care a fost depus, ci merge spre celula nervoasă, pentru că aceasta îl primește și îl cultivă.

Cauzele intime pentru care unele celule recepționează și cultivă un virus, altele îl recepționează dar nu-l cultivă, iar altele, în fine, nici nu-l primesc, nici nu-l cultivă sînt necunoscute, deși s-au făcut cercetări numeroase în această privință. Procesele de adsorbție ar avea, în fixarea virusului pe celulă, un rol extrem de important. S-a stabilit, de exemplu, că fixarea bacteriofagului pe celula sensibilă este cu atît mai masivă cu cît vitalitatea celulelor este mai însemnată. Astfel, bacteriile care se află în faza activă de multiplicare adsorb o cantitate mai mare de bacteriofag decît cele care se găsesc în faza de repaus. Concentrația în săruri influențează, la fel, procesul de fixare a particulelor de bacteriofag pe celulele bacteriene. S-a mers încă și mai departe și se afirmă că în celula bacteriană există anumite fracțiuni chimice care fixează bacteriofagul și că aceste fracțiuni sînt de natură antigenică.

PLURALITATEA VIRUSURILOR

Pluralitatea este proprietatea unei specii de virus de a se găsi, în natură, sub mai multe forme imunologic distincte. Un fenomen de acest fel a fost descris, pentru prima oară, la virusul febrei aftoase, în 1922, de V a l l é e și C a r r é.

Autorii au făcut această descoperire urmărind evoluția unei epizootii de febră aftoasă. Ei constată, cu această ocazie, că aceleași animale se îmbolnăvesc la scurte intervale de timp, de două ori, prezentînd, în ambele cazuri, simptome asemănătoare și de aceeași gravitate. Această observație nu se putea explica decît în două feluri și anume: ori prima infecție nu a lăsat nici o urmă de rezistență, ori animalul se infecta prima oară cu un tip de virus și a doua oară cu un alt tip de virus.

Această din urmă ipoteză a fost confirmată de experiență. Într-adevăr, s-au putut izola, în cursul diverselor epizootii, tulpini de virus care sînt imunologic distincte, în sensul că un animal infectat cu o tulpină se poate infecta, după vindecare, cu o altă tulpină, făcînd a doua oară aceeași infecție și se poate infecta, apoi, chiar cu o a treia tulpină, făcînd aceeași formă de boală ca și la prima infecție. Aceste cercetări au demonstrat că în cadrul speciei virusului febrei aftoase există trei tipuri care au fost numite fie O, A și C (autori francezi), fie A, B, C (autori germani). Deosebirea esențială între aceste trei tipuri constă în aceea că fiecare tip imunizează solid un animal față de el însuși, dar de loc sau foarte puțin față de celălalt tip.

În laborator, pentru identificarea practică a tipului de virus al febrei aftoase care produce o epizootie se folosesc cobai imunizați cu cele trei tipuri cunoscute: O, A și C. Tulpina izolată aparține, de exemplu, tipului O, dacă cobaii vaccinați cu tipul O rezistă la infecția cu tulpina necunoscută, în timp ce cobaii vaccinați cu tipurile A și C se infectează.

A. Ciucă (1929) și, după el, alți cercetători, au arătat că cele trei tipuri se pot distinge serologic și anume prin reacția de fixare a complementului. Aceste rezultate serologice arată că cele trei tipuri de virus al febrei aftoase diferă din punct de vedere al structurii lor antigenice. Mai mult încă, metoda serologică a permis să se distingă, în cadrul aceluiași tip, mai multe variante.

Existența, în cadrul aceleiași specii, a mai multor tipuri de virus, prezintă o importanță practică deosebită și, în special, trebuie ținut seama de acest fenomen în prepararea mijloacelor specifice de combatere — seruri și vaccinuri. Într-adevăr, un vaccin antiaftos nu va proteja un animal față de febra aftoasă decît în cazul cînd el este preparat din toate cele trei tipuri de virus. La fel, un ser antiaftos nu va asigura protecția unui animal decît dacă el a fost preparat cu toate cele trei tipuri.

În cursul epizootiei de febră aftoasă din 1951—1952 s-a semnalat apariția de noi variante antigenice care se disting serologic. Unele din aceste variante care apar, în special, în cadrul tipului A și numite A_1, A_2, A_3 etc. par a rupe imunitatea conferită de un vaccin preparat cu cele trei tipuri, ceea ce înseamnă că ele se disting imunologic de tipurile cunoscute. Fenomenul de variație pare a fi deci foarte activ la această specie de virus.

Ceea ce este valabil pentru febra aftoasă este valabil și pentru alte viroze și, pentru acest motiv, s-au făcut cercetări cu scopul de a preciza dacă fenomenul de pluralitate nu este prezent și la alte specii de virusuri. Aceste cercetări au arătat că la cele mai multe specii de virus tulpinile cercetate sînt imunologic identice. Astfel se comportă virusul variolei ovine, virusul pestei porcine, virusul bolii lui Aujeszky etc. În alte cazuri însă s-a

Scanned with OKEN Scanner

constatat, ca şi la virusul febrei aftoase, existenţa unor tipuri imunologic distincte. Numeroşi cercetători au arătat, de exemplu, că virusul jigodiei carnasierelor se poate prezenta sub mai multe tipuri. Cerkaski constată, în această privinţă, că un grup de căţei care au fost vaccinaţi cu un vaccin preparat cu virus din regiunea Moscova şi care au rezistat la o infecţie de control făcută cu virus de aceeaşi origine, s-au infectat cînd au fost injectaţi cu virus din regiunea Leningrad sau Sverdlovsk. Aceste date pun deja în evidenţă existenţa a două tipuri de virus jigodios : Moscova şi Leningrad—Sverdlovsk. Probabil că există mai multe.

Virusul gripei umane prezintă, la fel, mai multe tipuri imunologice distincte, din care două, şi anume tipurile A şi B, au fost bine studiate. Existenţa mai multor tipuri de virus gripal explică frecventele recidive ce se observă în această maladie.

*

Problema tipurilor de virus rămîne încă deschisă. Cercetările viitoare ar putea să găsească tipuri de virus la speciile la care, pînă în prezent, nu existau şi să descopere noi tipuri la speciile de virus la care s-au identificat deja două sau mai multe tipuri.

Fixitatea şi originea tipurilor. Cercetări privind această problemă s-au făcut, mai cu seamă, asupra virusului febrei aftoase. Manninger admite, pe baza cercetărilor sale experimentale, că tipurile A şi C prin treceri pe cobai tind să se transforme în tipul O, care ar fi tipul de origine. In această privinţă mai este de semnalat că numeroşi cercetători au izolat tulpini din diverse focare epizootice care nu se pot clasa într-unul din tipurile cunoscute. Aceste fapte arată că virusul febrei aftoase are aptitudini de variaţie, de schimbare a structurii sale antigenice şi deci fizico-chimice, fără ca prin aceasta el să piardă însuşirea esenţială de a produce o infecţie avînd caracterele febrei aftoase.

Cu privire la originea diverselor tipuri ale unui virus Kindiakov şi colaboratorii (1952) afirmă că ele s-au produs dintr-un virus primitiv care şi-a schimbat tipul imunologic, s-a disociat prin treceri repetate pe animale. In sprijinul acestei teze trebuie citată, printre alte fapte, constatarea că încercările de imunizare încrucişată au arătat că mai subsistă încă chiar între cele trei tipuri O, A şi C, de virus al febrei aftoase, unele relaţii antigenice şi că, din această cauză, un tip conferă unui animal pe lîngă imunitate solidă faţă de el însuşi şi un slab grad de imunitate faţă de alt tip.

Apariţia unor noi variante în cadrul aceluiaşi tip este, după Kindiakov, o consecinţă a schimbării condiţiilor de mediu.

Virusul, conform principiilor miciuriniste, rămîne acelaşi atît timp cît el întîlneşte organisme cu aceeaşi structură imunobiologică ; cînd însă întîlneşte un organism rezistent, virusul se transformă în alte variante faţă de care organismul respectiv nu mai este rezistent. Această însemnată capacitate de variaţie este unul din factorii care intervine, desigur, într-o mare măsură, în difuzibilitatea febrei aftoase. Proprietatea virusului de a se modifica atunci cînd întîlneşte un organism imun a fost demonstrată experimental de Kindiakov, care a reuşit să transforme virusul C în A prin cultivarea pe cobaii imuni faţă de tipul C.

Scanned with OKEN Scanner

NATURA VIRUSURILOR

Particula de virus, datorită perfecționărilor aduse în ultimul timp metodelor fizice, chimice și mai ales optice de cercetare, a putut fi mai îndeaproape cunoscută. Ea este, de cele mai multe ori, o aglomerare de molecule chimic identice, care, în regulă generală, nu constituie o celulă [1] și nu este separată de mediul ambiant printr-o membrană.

Fiind total sau parțial lipsită de fermenți, ea nu-și poate construi singură, din materialele pe care le găsește în mediul ambiant, substanța proprie și, în acest scop, face apel la echipamentul enzimatic al celulei gazdă, căreia îi deviază activitatea normală de sinteză, în așa fel, încît fermenții celulei gazdă sintetizează substanța constituentă a parazitului. Mecanismul intim al acestei aserviri enzimatice este încă necunoscut [2]. La fel este necunoscut și mecanismul prin care virusul își păstrează, în ambianța celulei gazdă, individualitatea sa chimică, cu alte cuvinte rezistența particulei de virus la acțiunea dezintegrantă a fermenților celulari.

Păstrarea individualității chimice în cadrul celulei gazdă are, de altfel, alături de multiplicare, drept consecință, procesul patologic.

O dată cunoscute atributele esențiale ale virusurilor, cercetătorii s-au întrebat dacă virusurile sînt sau nu viețuitoare, dacă unitatea virulentă poate fi atașată materiei vii sau celei moarte. Pentru a lămuri această problemă este necesar, în primul rînd, să definim viața, să vedem care sînt caracterele ei esențiale.

Viața, atît timp cît concepția metafizică a lui Virchow a dominat biologia, s-a identificat cu celula, afirmîndu-se, în acest sens, că fenomene vitale nu pot exista în afara unei organizații celulare, unei structuri morfologice și chimice complexe.

Concepția celulară a vieții crea un gol între materia vie și materia moartă și atît teoretic cît și practic ea nu putea corespunde realității. În cadrul acestei concepții, natura virusurilor ca ființe vii, necelulare, nu-și putea găsi o rezolvare. Cercetările sovietice au infirmat însă teoria celulară a lui Virchow, demonstrînd că viața poate exista și în afara celulei.

Cercetătoarea sovietică O. B. Lepeșinskaia afirmă că celulele se pot crea și din materia organică vie, contrazicînd aforismul virchowian că orice celulă se naște din altă celulă. Aceste cercetări, pe lîngă altele, par a

---

[1] Unii cercetători admit că virusurile de dimensiuni mari, cum este de exemplu virusul vaccinal, se apropie prin structura lor morfologică (prezența unei membrane și a unei formații nucleare) și compoziția lor chimică (prezența în particulă a mai multor grupe proteice, precum și a unor complexe lipidice), de o celulă. Marea majoritate a virusurilor nu au nimic însă din însușirile unei celule

[2] Se admite că, în acest proces de aservire, acizii nucleici, ar putea avea un rol însemnat. S-a semnalat deja că acidul dezoxiribonucleic al pneumococului S de tip III poate produce, la pneumococul R de tip II, o schimbare metabolică.

Intr-adevăr, pneumococul R de tip II, în prezența acidului dezoxiribonucleic, provenind din pneumococul S de tip III, secretă substanța capsulară a pneumococului S de tip III și nu pe a sa proprie. Această observație a făcut pe unii cercetători să admită că acidul dezoxiribonucleic al pneumococului S de tip III se comportă ca un virus.

Generalizînd s-ar putea admite că unii acizi nucleici, care fac parte din particula de virus, ar putea induce, în celula gazdă, o schimbare metabolică în sensul celei găsite la pneumococi. Celula gazdă ar sintetiza, astfel, materia care constituie particula virulentă.

Scanned with OKEN Scanner

arăta că viaţa se prelungeşte şi dincolo de celulă, că poate exista şi în afara ei şi că virusurile pot fi vieţuitoare, deşi nu sînt celule.

Caracteristica principală şi esenţială a materiei vii nu este de altfel o anumită structură morfologică, ci o constituie, în primul rînd, capacitatea ei de a asimila, de a transforma variate substanţe din mediul ambiant în compuşi identici cu ea însăşi. Materia moartă nu posedă o asemenea proprietate. Un compus chimic inert nu transformă un alt compus într-un produs identic cu sine însuşi. Glucoza, de exemplu, nu transformă, prin contact, galactoza în glucoză sau glicerina în glucoză. Este drept că un cristal de sare pus într-o soluţie saturată, tot de sare, provoacă cristalizarea substanţei în soluţie. Această transformare a moleculei nu este însă de natură chimică, ci numai fizică. Cristalul adăugat nu provoacă decît o nouă dispoziţie moleculară şi nu o transformare a însăşi moleculei. Un asemenea proces, de altfel, nu poate fi comparat cu complexele procese de sinteză pe care le întîlnim la vieţuitoare, în special la cele autotrofe, care, plecînd de la compuşii minerali simpli sau chiar de la elemente N, S, H, construiesc complicatul eşafodaj chimic, care constituie materia vie.

Asimilaţia este una din însuşirile vieţii şi virusurile filtrabile au această însuşire şi trebuie integrate, din această cauză, printre fiinţele vii. Ele posedă însă şi alte însuşiri care caracterizează viaţa. Astfel, ele se *multiplică,* îşi *transmit caracterele la descendenţii* care rezultă din această multiplicare şi, în fine, *se adaptează la mediu,* modificîndu-şi caracterele.

Multiplicarea virusurilor a fost dovedită în nenumărate rînduri şi această însuşire stă la originea contagiozităţii maladiilor pe care le provoacă. Puterea lor de multiplicare este imensă. Astfel, a miliarda parte dintr-un mililitru de lichid alantoamniotic provenind de la un embrion de găină, mort în urma infecţiei cu virusul pestei aviare, poate provoca infecţia unui embrion sănătos. Acesta din urmă moare după 2—3 zile şi fiecare mililitru din lichidul său alantoamniotic conţine cîte 1 miliard de doze minime infectante de virus. Aceeaşi prodigioasă multiplicare o putem observa la virusul pestei porcine, virusul febrei aftoase etc.

Unii cercetători, privind virusurile numai sub aspectul acţiunii lor asupra unui substrat, le-au apropiat de enzime. Într-adevăr, enzimele ca şi virusurile sînt dotate cu capacitatea de a transforma diversele materii, fie în sensul degradării lor, fie în sensul cuplării lor cu alte materii. Produşii rezultaţi în urma acestei acţiuni nu sînt însă asemănători cu molecula-enzimă care a catalizat reacţia, ceea ce deosebeşte, în primul rînd, fermenţii de virusuri. În al doilea rînd, enzimele nu se multiplică în cursul acţiunii lor. Bacteriofagul, prin activitatea sa, se comportă ca un ferment, dar, spre deosebire de acesta, el se multiplică acţionînd şi de aceea este o fiinţă vie. Materia vie spre deosebire de cea moartă se reproduce mereu, reproducerea fiind una din condiţiile ei de existenţă. Viaţa nu stă pe loc, nu se împietreşte în forme imuabile. Ea este în continuă devenire, într-o continuă creaţie. O dată această creaţie încetînd, materia vie se transformă în materie moartă, în forme incapabile să se multiplice şi să provoace modificarea substanţelor din jur.

Transmisibilitatea caracterelor constituie, pe lîngă capacitatea de asimilaţie şi multiplicare, a treia proprietate esenţială a vieţii şi ea este pre-

Scanned with OKEN Scanner

zentă şi la virusurile filtrabile. O specie de virus ca şi o specie animală sau vegetală îşi transmite caracterele moştenite sau dobîndite, la urmaşi. Cercetarea diverselor specii de virus şi urmărirea lor în timp a arătat că această lege, care stăpîneşte materia vie, se aplică şi virusurilor filtrabile. Virusul rabic, de exemplu, produce, la cîine, om sau alt animal, aceleaşi simptome clinice pe care le producea şi acum 2000—3000 de ani, aşa cum ne sînt relatate de autorii antici. În timpurile noastre, în mîinile lui Pasteur, o tulpină de virus rabic şi-a schimbat însă caracterele, a dobîndit însuşiri noi. Aceste însuşiri noi s-au transmis, în mod constant, timp de 70 de ani şi în curs de 1 782 de treceri pe iepure. Modificările suferite de un virus se ancorează deci solid în structura chimică a particulei virulente şi fac ca toate particulele ce se nasc dintr-o asemenea particulă să fie identice cu ea.

Însuşirile unui virus nu au însă o fixitate metalică. Materia vie se caracterizează şi printr-o importantă plasticitate, printr-o mare putere de adaptare la mediu şi această însuşire o găsim şi la virusuri. Ele îşi transmit caracterele atîta timp cît condiţiile de mediu rămîn aceleaşi, dar şi le modifică, conform legilor cunoscute şi valabile pentru toate vieţuitoarele, de îndată ce condiţiile de mediu se schimbă. Plasticitatea este o condiţie a vieţii şi viaţa ar fi dispărut de mult de pe pămînt dacă vieţuitoarele nu aveau această însuşire. Probe de plasticitate şi deci de variabilitate găsim, din abundenţă, la diversele specii de virus. Astfel, virusul rabic de stradă a fost transformat de Pasteur în virus fix, un virus cu alte proprietăţi decît cele ale virusului de stradă. Virusul fix, menţinut mereu în aceleaşi condiţii, şi-a conservat caracterele, aşa cum am spus mai sus. Modificînd însă condiţiile de mediu, injectîndu-l la iepure în nervi şi nu în creier, virusul fix, aşa cum a arătat Şt. Nicolau şi Kopciowska (1934), tinde să se întoarcă la virusul de stradă, capătă unele din proprietăţile acestuia. El redevine, astfel, capabil să producă constant o septinevrită rabică şi să provoace apariţia corpusculilor Babeş-Negri.

Se pot da şi alte exemple. Astfel, virusul vaccinal, în mod obişnuit, nu produce, cînd este inoculat pe cale intracerebrală, o encefalită mortală la iepure, însă, în anumite condiţii de lucru (inocularea intratesticulară şi de aici intracerebrală, Levaditi, Nicolau şi Harvier, 1921), el devine constant patogen pe cale intracerebrală. Virusul, sub influenţa factorilor de mediu, s-a transformat dintr-un virus dermotrop în unul neurotrop, dermovaccinul a devenit neurovaccin. In acelaşi sens, se mai poate cita transformarea virusului variolei ovine. Intr-adevăr, tulpinile acestui virus, izolate din mediul lor natural, adică de la oaia bolnavă, sînt dermotrope; trecute însă, în repetate rînduri, pe cale subcutanată, ele se adaptează ţesutului conjunctiv subcutanat şi pierd afinitatea lor pentru celulele dermului. Ele se transformă deci din dermotrope în mezenchimotrope. Virusul febrei aftoase pierde, prin treceri repetate pe cobai, patogenitatea sa pentru bovine. Mai mult încă, virusul adaptat pe cobai poate fi fixat pe creier de şoarece şi după 150 de pasagii pe creier de şoarece el omoară aceste animale în proporţie de 100%, iar după 700 de pasagii pe şoarece îşi pierde patogenitatea pentru cobai. Aceste date dovedesc, în mod peremptoriu, plasticitatea virusurilor.

Scanned with OKEN Scanner

Insuşirile fundamentale ale virusurilor filtrabile sînt deci cele ale tuturor vieţuitoarelor. Este drept că ele nu constituie celule, nu au o constituţie chimică variată, nu au un echipament enzimatic complet, dar, datorită unor proprietăţi proprii necunoscute încă, ele sînt, în medii convenabile, generatoare de materie identică cu aceea care se găseşte în ele însele. Viaţa este în primul rînd asimilaţie. Virusurile, prin mijloacele particulare şi diferite de ale celorlalte vieţuitoare, asimilează ; materia care le constituie este deci vie, dotată cu atributele vieţii. Virusurile sînt deci forme de viaţă necelulară, neorganizată în celule.

Natura vie a virusurilor rezultă, de altfel, şi din compoziţia lor chimică. Ele sînt albumine şi Engels, în Anti-Dühring, spune în această privinţă : „Ori unde întîlnim viaţa, o găsim legată de un corp albuminos şi ori de cîte ori întîlnim un corp albuminos care nu se află în stare de descompunere găsim, fără nici o excepţie, şi fenomenele vieţii".

ORIGINEA VIRUSURILOR

Virusurile, prin însuşirile lor fundamentale, se clasează, în mod neîndoios, printre vieţuitoare. Ne putem întreba acum ce relaţii există între acest tip de vieţuitoare şi alte fiinţe organizate, care este momentul apariţiei lor pe pămînt şi în ce condiţii şi-au făcut ele apariţia ? Aceste întrebări, de un pasionant interes biologic şi filozofic, nu pot primi decît un răspuns ipotetic. Nu putem, într-adevăr, preciza momentul apariţiei lor pe pămînt, căci paleontologia nu ne dă nici o indicaţie cu privire la existenţa lor în diversele epoci geologice. Admitem că virusurile, ca şi bacteriile şi ciupercile, de altfel, au apărut pe pămînt o dată cu viaţa, dar nu avem nici o probă materială a acestei afirmaţii. Răspunsurile, la întrebările de mai sus, în absenţa unor date certe, sînt deductive şi deducţiile se bazează exclusiv pe cunoştinţele pe care le avem despre virusuri şi, în general, despre vieţuitoarele inferioare în momentul de faţă. Aceste cunoştinţe au permis să se formuleze trei ipoteze principale cu privire la originea virusurilor filtrabile.

O primă ipoteză admite că virusurile filtrabile derivă din alte vieţuitoare, constituind forme de degradare a acestora. S-a afirmat, în special, că virusurile nu sînt altceva decît bacterii care, sub influenţa parazitizmului, şi-au simplificat structura morfologică, au pierdut unii componenţi celulari, cum sînt fermenţii, care nu le mai erau necesari în noul mediu în care se găseau. Această ipoteză se bazează atît pe cunoaşterea însuşirilor esenţiale ale virusurilor, cît şi pe unele constatări de natură bacteriologică. Se cunosc, astfel, specii bacteriene care, sub influenţa parazitizmului, au pierdut unii fermenţi sintetizanţi esenţiali. Bacilul tifosului, unii stafilococi, de exemplu, au pierdut capacitatea de a sintetiza triptofanul.

Ceea ce se întîmplă cu bacilul tifosului şi cu stafilococii s-a întîmplat, conform acestei ipoteze, cu strămoşii bacterieni ai actualelor specii de virus. Unii din aceşti strămoşi, sub influenţa parazitizmului, s-au redus la un agregat izomolecular, reprezentînd nucleoproteida celulei bacteriene.

Tot în sprijinul acestei ipoteze s-a folosit, de către unii cercetători, printre care bacteriologul rus G a m a l e i a, constatarea că unele viroze

se asociază constant cu diverse bacterii. Astfel, pesta porcină se complică prin intervenţia unor bacterii ca *Salmonella suipestifer, Pasteurella animalium,* jigodia cîinilor cu diverşi strepotococi sau bacterii Gram negative etc. Aceste bacterii au fost socotite ca forme vizibile ale virusurilor, iar virusurile ca forme invizibile ale bacteriilor.

In acelaşi sens, amintim că Boşian a mers şi mai departe şi el admite nu numai că virusurile provin din bacterii, dar că ele, chiar astăzi, în anumite condiţii de mediu, se pot transforma în forme microscopice vizibile şi cultivabile pe medii inerte. Rezultatele cercetărilor sale au fost rezumate, de autor, în următoarele trei puncte.

1. Virusurile filtrabile sînt capabile să se transforme în forme bacteriene, care ulterior pot fi din nou transformate în forme filtrabile. Virusurile filtrabile se pot cultiva pe medii inerte, cu condiţia ca ele să conţină albumine complexe (nucleoproteide) şi în aceste medii ele dau naştere la bacterii. Bacteriile care au rezultat în acest fel se transformă în virusuri cînd sînt trecute din nou în celula vie.

2. Formele bacteriene ale speciilor cunoscute sînt capabile să se transforme în forme filtrabile (virusuri), care din nou pot fi transformate în forme bacteriene.

3. Virusurile filtrabile, ca şi formele bacteriene sînt capabile să se transforme în cristale, care din nou pot fi transformate în virusuri filtrabile şi forme bacteriene. Cristalele constituie, după Boşian, una din proprietăţile de bază ale organismelor monocelulare vii şi constituirea lor are drept scop conservarea speciei.

Aceste reguli sînt valabile, după Boşian, pentru o serie de virusuri, ca: virusul anemiei infecţioase a cailor, virusul pestei porcine, virusul pestei aviare etc.

Asupra acestor concluzii, lumea ştiinţifică păstrează o mare rezervă şi unii cercetători, cum sînt Kalina, Silber, Muromţev le consideră ca nefondate şi inacceptabile.

Ipoteza transformări virusurilor în bacterii şi a bacteriilor în virusuri a fost susţinută şi de alţi cercetători care se bazau, în special, pe faptul că unele culturi bacteriene sînt capabile să reproducă o infecţie virotică. Este îndeobşte cunoscut cazul cercetătorului german Kutschinsky care a reuşit cu o cultură bacteriană izolată dintr-un caz de febră galbenă să reproducă această infecţie la maimuţe. Prin învechire însă cultura bacteriană a pierdut această proprietate. Era, în acest caz, o conservare a virusului în cultura bacteriană, aşa cum se putea uşor bănui şi aşa cum au dovedit, în condiţii experimentale, Silber şi elevii săi. Aceştia au demonstrat, într-adevăr, că o serie de virusuri sînt adsorbite de bacterii sau ciuperci (levuri) şi, mai mult încă, ele se pot înmulţi un timp oarecare, dar nu prea lung, în simbioză cu aceste vieţuitoare, dar aceasta nu înseamnă că virusul s-a transformat în bacterii şi bacteria în virus.

Procesele de adsorbţie şi de simbioză explică mai bine, după Silber, virulenţa unor culturi bacteriene decît teoriile transformiste emise de unii cercetători.

A doua ipoteză atribuie virusurilor o origine endogenă. Conform acestei ipoteze, virusurile s-au născut şi se nasc fie din însăşi celula parazitată, fie dintr-o proteină celulară străină de specia receptivă. J. Bordet şi M. Ciucă, Gamaleia şi alţii considerau, în lumina acestei concepţii, că bacteriofagul este un ferment cu calităţi particulare care se naşte din însăşi celula bacteriană. Acest ferment capătă, sub influenţa unor factori de mediu, proprietăţi noi, în special proprietatea de a produce liza tuturor celulelor identice celor din care el a luat naştere, precum şi însu-

Scanned with OKEN Scanner

şirea de a se multiplica. Bacteriofagia, după această concepţie, este un aspect particular al autolizei, iar bacteriofagul un autoferment cu proprietăţi infectante. Alţi cercetători au admis că chiar unele virusuri patogene pentru om, cum este de exemplu virusul herpetic, se pot naşte spontan, în celulele organismului receptiv. O asemenea origine se atribuie şi virusurilor cancerigene. Unii microbiologi au mers şi mai departe şi, îmbrăţişînd concepţiile biologice metafizice morgano-weismanniste, au identificat virusurile cu genele, adică cu particulele purtătoare ale eredităţii, considerîndu-le gene rătăcite.

S u h o v şi alţi cercetători admit, la fel, că virusurile au o origine endogenă, celulară, dar că ele nu se nasc în însăşi celula receptivă, ci provin dintr-o altă celulă aparţinînd altei specii decît cea receptivă. Virusurile patogene pentru plante reprezintă, după aceşti autori, o albumină vegetală care s-a transmis la planta receptivă de la o plantă de altă specie şi care şi-a conservat proprietatea de a rămîne ea însăşi, adică de a rezista la acţiunea de dezintegrare a fermenţilor plantei în care a pătruns şi de a se înmulţi chiar în interiorul celulelor sale. Transmiterea albuminei de la o plantă la alta s-a făcut, de cele mai multe ori, prin insecte, ceea ce ar explica şi faptul că maladiile cu virus sînt mult mai frecvente la fanerogame, adică la plantele cu flori, decît la criptogame. Insecta sugătoare, care se întreţine pe fanerogame, a introdus în plantă proteina unei alte plante, proteină care a căpătat calitatea de virus patogen prin însăşi constituţia ei chimică străină de a celulei gazdă. S u h o v (1949) rezumă astfel această ipoteză :

„Mii şi mii de ani, mase enorme de protoplasmă intră prin diferite mijloace (contact direct, insecte sugătoare etc.) în relaţii intime între ele. In marea majoritate a cazurilor, corpusculii, înfipţi în protoplasma străină, rămîn inerţi sau sînt descompuşi. Procesul inoculărilor naturale, care se produce pe o scară imensă, a selecţionat însă, în decursul veacurilor, acele albumine care au proprietatea de a se reproduce bine în protoplasma străină şi care, în consecinţă, au devenit virusuri". Şi în altă parte tot el spune : „Virusurile au originea în orice albumină celulară care este înzestrată cu două proprietăţi şi anume : 1) autoreproducerea şi 2) transmisibilitatea".

Generarea, naşterea spontană a virusurilor, din însăşi celula care va fi distrusă de ele sau dintr-o albumină străină este contrazisă de o serie de observaţii, printre care cea mai importantă este aceea că, pînă în prezent, nu s-a putut observa apariţia spontană a unei viroze. Infecţia cu virus are totdeauna o origine şi apare la un organism în urma contactului cu un material infecţios. Bacteriofagia, pe studiul căruia, de altfel, se sprijină, în mare parte, teoria endogenă, apare uneori ca un fenomen spontan, dar, dată fiind ubicvitatea bacteriilor şi deci şi a bacteriofagului, precum şi aspectele variate ale raporturilor dintre parazit şi gazda sa şi, în special, posibilitatea celulelor bacteriene de a purta bacteriofagul, fără ca acesta din urmă să tulbure manifest biologia celei dintîi, spontaneitatea fenomenului poate fi numai aparentă. In acelaşi fel, se poate explica faptul, observat de unii cercetători, că altoirea unei variante de cartofi, cu varianta cunoscută sub numele de regele Edward, duce regulat la apariţia unei viroze la varianta altoită. Este posibil ca varianta regele Edward să fie purtătoare de virus, fără ca ea să prezinte semne de boală, tot aşa cum unele bacterii poartă bacteriofagul fără a se liza.

Scanned with OKEN Scanner

Bacteriofagia, ca şi celelalte viroze, apare deci ca o maladie de contact, iar bacteriofagul ca un factor morbigen extern şi independent de celula parazitată. Cercetările serologice făcute de Krestovnikova şi colaboratorii (1952) au arătat, în acest sens, că nu totdeauna există relaţii antigenice între bacteriofag şi bacteria care îl poartă.

Ipoteza transmiterii proteinei unei specii de plantă la o altă specie şi transformarea ei aici într-o proteină virus, într-un agent morbigen, nu a putut fi confirmată experimental. Inoculările proteinei unor plante la plante de altă specie nu au dat naştere la o stare morbidă şi la generarea unui virus. Este drept însă că posibilităţile de transmitere pe care le are natura sînt incomparabil mai mari decît cele pe care le poate realiza experienţa.

A treia ipoteză admite că virusurile au apărut spontan în natură şi reprezintă primele forme de viaţă de pe pămînt, reprezintă forma precelulară a vieţii sau plasma ancestrală (C. Levaditi). In loc ca ele să fie considerate ca rezultatul unei degenerări simplificative a organizaţiei celulare, virusurile sînt, conform acestei ipoteze, o formă de viaţă primară, un embrion al vieţii individualizate, premergătoare formelor celulare.

Aceste forme primitive de viaţă au apărut şi s-au născut într-o fază din evoluţia planetei noastre, cînd condiţiile fizico-chimice permiteau sinteze organice în afara vieţii.

De altfel, aşa cum reiese din ultimele cercetări astronomice, compuşi organici există în atmosfera planetelor şi chiar în atmosfera soarelui, în condiţii în care viaţa nu este posibilă. Aceste cercetări dovedesc că asemenea compuşi se pot produce în afara vieţii, că viaţa nu are monopolul sintezelor organice. Este de presupus că şi pe pămînt produşi organici simpli au existat înaintea apariţiei oricărei fiinţe vii şi că din ei s-au născut produşi chimici din ce în ce mai complecşi, pînă ce s-a ajuns la marile molecule proteice. Acestea din urmă, datorită proprietăţilor lor, s-au putut grupa, dînd aşa-zisele picături de coacervate. Coacervatele reprezintă o aglomerare de molecule proteice separte, în soluţie apoasă, sub forma unei picături bine diferenţiate. Apariţia unor asemenea picături, în învelişurile apoase primordiale ale pămîntului, a constituit un pas important în procesul de apariţie a vieţii. Pînă în acel moment substanţele organice au fost dizolvate uniform în apele mărilor şi oceanelor primordiale şi ele au fost legate indisolubil de această hidrosferă, de întreg mediul lor. Odată cu formarea coacervatelor, moleculele diverselor proteine s-au grupat în sisteme complexe, care s-au separat sub formă de picături, de soluţia înconjurătoare. Fiecare picătură exista ca o formaţie individuală de sine stătătoare, poseda o structură specifică şi era separată de mediul ambiant printr-un anumit hotar. Pe baza acestei separări a sistemelor proteice a putut să se creeze unitatea dialectică dintre organism şi mediu, care a constituit un factor hotărîtor în procesul apariţiei şi dezvoltării vieţii pe pămînt (Oparin, 1953). Trecerea de la coacervate la proteine vii, adică la organizaţii avînd un schimb echilibrat de substanţe plastice şi energetice cu mediul ambiant, a însemnat un salt calitativ important, a însemnat trecerea de la neanimat la animat. Prima formă animată nu a fost probabil o celulă, ci o formă precelulară.

Se poate admite că virusurile filtrabile sînt descendenţii acestor proteine vii, acestor forme precelulare de viaţă, care, la rîndul lor, au derivat din coacervate. Suhov (1953), renunţînd la teoria endogenă, sprijină

această afirmaţie şi pe observaţiile făcute de paleontologi, observaţii care arată că toate formele de organisme care au existat cîndva pe pămînt îşi au astăzi reprezentanţii lor. Virusurile nu pot fi şi ele deci decît reprezentanţii unor forme care au existat cîndva pe pămînt.

Albumina (şi virusurile filtrabile nu sînt altceva decît o albumină vie) a luat naştere, scrie Engels, ca rezultat al dezvoltării materiei organice şi a servit la început ca bază din care, mai tîrziu, ca rezultat al evoluţiei, au putut să se dezvolte organismele celulare. Putem să admitem deci, conform concepţiei formulate de Engels, că albumina şi, în consecinţă, ceea ce numim astăzi virusuri filtrabile, stau la temelia vieţii, constituie prima formă de viaţă care a apărut pe pămînt. Această formă de viaţă s-a născut, în urma unei lungi evoluţii, din materia organică. Aceasta din urmă, în anumite condiţii, s-a putut grupa constituind întîi molecula virus şi apoi, pe cale evolutivă, celelalte vieţuitoare din ce în ce mai complexe. Moleculele virus astfel constituite se puteau iniţial, şi în condiţiile de atunci, multiplica în afara celulei vii. Ele au devenit parazite obligatorii cînd condiţiile terestre s-au modificat în aşa fel încît ele nu se mai puteau multiplica independent. In acest moment, unele din ele, pentru a se conserva, au invadat vieţuitoarele cu organizaţie celulară care luaseră deja naştere şi au devenit astfel parazite.

Conform acestei ipoteze, virusurile nu se nasc, în organismul parazitat, din fermenţii proprii şi nu sînt nici proteine străine care au căpătat însuşirile de multiplicare şi de transmitere, ci sînt vieţuitoare independente, avînd faţă de organismul sensibil aceeaşi poziţie ca şi bacteriile patogene, adică sînt în afara lui, sînt exogene. Numeroase argumente sprijină această concepţie. Unele din ele au fost deja amintite. S-a spus, în acest sens, că o viroză nu apare spontan, ci numai în urma unui contact dintre organismul bolnav şi organismul receptiv. In afară de argumentele expuse, mai sînt şi altele. Astfel, structura complexă a unor particule de virus cum este virusul vaccinal nu se poate împăca cu teoria generării spontane a virusurilor din fermenţi sau din nucleoproteida proprie sau străină. Un argument important în sprijinul naturii exogene îl constituie şi constatarea că virusurile, din punct de vedere al acţiunii lor asupra organismului şi al reacţiunii organice pe care o produc, se comportă, în linii generale, la fel ca şi bacteriile patogene. Legile care stăpînesc modul de răspîndire a bacteriozelor sînt valabile şi pentru viroze.

Anticorpii antibacterieni care se produc într-un organism se comportă la fel ca şi anticorpii antivirus. Acest mod identic de comportare denotă că cele două grupe de vieţuitoare au multe însuşiri comune.

Există desigur diferenţe între bacterii şi virusuri cum ar fi, de exemplu, rezistenţa unor virusuri (virusul mozaicului tutunului, virusul pestei porcine) faţă de unii factori fizici şi chimici, dar aceste diferenţe nu sînt esenţiale şi le întîlnim şi în lumea bacteriană, aşa că ele nu pot constitui argumente pentru a atribui virusurilor o altă origine decît bacteriilor.

*

Cunoaşterea virusurilor filtrabile a împins şi mai departe frontierele vieţii şi a arătat că între materia vie şi materia moartă nu există o barieră uşor de trasat, că trecerea de la neanimat la animat se face treptat, că materia vie şi materia moartă constituie o unitate, un tot. Această unitate este evidentă cînd cercetăm formele cele mai simple ale vieţii cum sînt viru-

Scanned with OKEN Scanner

surile filtrabile. Intre omul gînditor şi firul de nisip există desigur diferenţe obiective enorme şi dacă judecăm materia vie şi moartă limitîndu-ne doar la aceste două exemple, desigur că vom ajunge la concepţii biblice despre viaţă şi originea ei. Judecînd însă materia vie în totalitate şi sub toate formele ei, ţinînd seama de capacitatea modificatoare a mediului în cursul nemăsurat al timpului, nu putem să nu căpătăm convingerea că materia este una şi aceeaşi şi că materia vie nu reprezintă, în fond, decît o organizare particulară a materiei.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA A IV-A

INFECŢIA MICROBIANĂ

GENERALITAŢI

Se înţelege prin infecţie orice stare morbidă care are drept cauză principală un microb sau produsele sale de secreţie. Turbarea, morva, bruceloza, tetanosul etc. sînt infecţii. Infecţiile comune omului şi animalelor şi care se transmit de la om la animale şi invers se numesc *zoonoze* [1]. Ştiinţa care cercetează modalităţile de difuziune a infecţiilor de la organismul bolnav sau din mediul natural la organismul sănătos se numeşte *epidemiologie* sau *epizootologie,* după cum urmăreşte procesul la specia umană sau la speciile animale.

Natura microbiană a infecţiilor a fost demonstrată în a doua jumătate a secolului al XIX-lea de către numeroşi cercetători. Pînă la acea dată au dominat teoriile mistico-religioase cu privire la originea infecţiilor, deşi au existat, şi încă din cele mai vechi timpuri teorii materialiste. Astfel, şcoala lui Hippokrat a fundamentat teoria miasmatică a infecţiilor, conform căreia bolile molipsitoare sînt produse de particule materiale, de miasme care se răspîndesc, din cadavre şi alte materiale intrate în putrefacţie, prin aer şi pătrund în organism odată cu acesta. Infecţiile au fost, în consecinţă mult timp socotite ca fiind de origine endogenă. Deabia în secolul al XVI-lea, o dată cu apariţia şi studiul sifilisului, Fracastorius fundamentează teoria contagiului şi contagiunei, el împărţind infecţiile în trei grupe, după modul lor de transmitere şi anume:

1. infecţii transmisibile prin contact *(per contactum),*
2. infecţii transmisibile prin obiecte *(per fomitem),*
3. infecţii transmisibile la distanţă *(per distans).*

Această clasificare e în linii generale şi astăzi valabilă.

I. P. Pavlov a stabilit principiile generale care reglează activitatea unui organism şi îi condiţionează evoluţia şi existenţa. Aceste principii sînt:

1. principiul unităţii organismului cu mediul ambiant;
2. principiul unităţii organismului;
3. principiul primatului sistemului nervos (nervism).

Infecţia este un proces organic care se încadrează în aceste principii generale. Prin urmare, ea nu trebuie considerată ca o consecinţă exclusivă a unui factor morbigen extern asupra organismului, ci ca un rezultat al interferenţei dintre factorul de boală şi organism. Microbul sau produ-

[1] Turbarea, antraxul, tuberculoza sînt zoonoze, dar tetanosul nu este, pentru că această boală, deşi este întîlnită şi la om şi la animale, nu se transmite direct de la animale la om şi invers.

Scanned with OKEN Scanner

sele sale de secreție nu decid singure de apariția infecției, așa cum socotea Pasteur, ci organismul, starea sa fiziologică, intervine și imprimă pecetea sa procesului. Numeroase fapte experimentale și de observație demonstrează acest lucru. Vom cita doar cîteva. Ciurilina (1915) și Gaiski (1944) observă că *Pasteurella pestis,* inoculată la animale în stare de hibernare, rămîne la locul de administrare și invadează cel mult ganglionii limfatici, în timp ce la cele în stare de veghe infecția are o evoluție rapidă și mortală. D. Ionescu (1932) face observații similare din care rezultă că infecția rabică are o evoluție mai rapidă la un arici în stare de veghe, în comparație cu un arici în stare de hibernare. Uciteli constată, în același sens că toxina difterică sau stafilococică nu produce necroza cutanată obișnuită la iepurii ținuți în stare de somn. Aceste observații demonstrează rolul pe care îl are organismul în apariția și dezvoltarea infecției.

Organismul avînd un rol așa de important în infecție, este necesar, în scopul prevenirii acestor stări morbide, să se cerceteze îndeaproape, în ce condiții de mediu, în ce stări fiziologice și în ce stări ale sistemului nervos organismul este în situația de maximă rezistență față de germenul patogen. Principiile pavloviste ne dau deci posibilitatea unei cunoașteri mai adînci și mai juste a procesului infecțios, cunoaștere care ne permite să intervenim mai eficient în înlăturarea sa.

CARACTERELE GENERALE ALE INFECȚIEI

Infecția se manifestă prin simptome foarte variate. Unele din aceste simptome se pot întîlni și în stări morbide neinfecțioase, altele sînt, într-o mare măsură, caracteristice infecției. Febra, de exemplu, este una din manifestările cele mai tipice ale infecției și, în general, se admite că orice stare febrilă este legată de un proces infecțios, de intervenția unui germen viu sau a produselor toxice secretate de un germen. Tot ca un simptom legat adeseori, dar nu exclusiv, de acțiunea microbilor, este modificarea raporturilor numerice și calitative dintre diversele elemente albe ale sîngelui. În unele infecții există leucocitoze, în altele, cum este de regulă în viroze, există, dimpotrivă, leucopenii.

În ceea ce privește simptomele fiecărei infecții, se întîlnește o însemnată variabilitate, care este în raport atît cu agentul etiologic, cît și cu modul de reacție a organismului. Însăși curba termică — intensitatea, durata, continuitatea sau discontinuitatea febrei — variază de la o infecție la alta. Pe această variabilitate a aspectului clinic și curbei termice se bazează, într-o mare măsură, diagnosticul diferențial dintre diversele infecții.

PERIOADELE UNEI INFECȚII

În cursul unei infecții se disting trei perioade și anume: de incubație, evolutivă și finală.

Perioada de incubație este timpul care se scurge de la pătrunderea germenului în organism și pînă la apariția primelor simptome perceptibile. Ea este timpul în care, în organism, se petrec o serie de acumulări cantitative ce duc, în cele din urmă, la un salt calitativ, adică la apariția stării de boală, la trecerea de la sănătate la boală.

Scanned with OKEN Scanner

Durata acestei perioade variază, în limite largi, de la o infecţie la alta şi, în cadrul aceleiaşi infecţii, de la un caz la altul. Perioada de incubaţie este, de exemplu, de cîteva ore în infecţiile experimentale produse de *Pasteurella animalium, Bacillus anthracis;* de cîteva zile pînă la cîteva săptămîni în cele produse de virusul rabic, bacilul tuberculozei, bacilul morvei etc. În cazul infecţiei rabice se constată diferenţe enorme în ceea ce priveşte durata perioadei de incubaţie. În laborator şi în cazul infecţiei pe cale intracerebrală, perioada de incubaţie este de 2—3 săptămîni, în condiţii naturale ea variază, în medie, de la 1—2 luni, dar s-au semnalat şi cazuri în care perioada de incubaţie a durat cîteva luni sau chiar cîţiva ani. Smelovski (1950), de exemplu, citează un caz, la om, în care simptomele clinice au apărut după 2 ani şi 7 luni de la muşcătură, iar Şt. Nicolau şi colaboratorii (1950) un altul (caz tratat cu vaccin antirabic) la care simptomele s-au produs la 6 ani după muşcătură. Variabilitatea duratei perioadei de incubaţie, în cazul aceleiaşi infecţii, este în funcţie de gradul de patogenitate a germenului, de doza de microbi pătrunsă în organism, de poarta de intrare şi de receptivitatea gazdei şi anume ea este cu atît mai scurtă, cu cît germenul este mai patogen, doza mai mare, poarta de intrare mai favorabilă şi gazda mai receptivă.

Starea sistemului nervos influenţează durata perioadei de incubaţie. Ciurilina şi Gaiski au arătat, de exemplu, că la animalele în stare de hibernare, perioada de incubaţie a infecţiei cu *Pasteurella pestis* durează cît hibernarea. Nicolau şi colaboratorii (1953) observă că la şobolanii cărora li se provoacă, zilnic, un somn medicamentos de 14—18 ore, perioada de incubaţie rabică a fost de 14,4 zile, faţă de 11,0 cît a durat la martori.

Existenţa perioadei de incubaţie arată că germenii nu pot provoca tulburări clinice de îndată ce au pătruns în organism.

Planles (1950) a urmărit, pentru a explica existenţa perioadei de incubaţie, soarta germenilor *(Salmonella typhi murium)* introduşi, în cantităţi variabile, per os, la şoareci, şi a constatat căci chiar administrările masive de germeni nu sînt imediat urmate de o multiplicare a lor. Dimpotrivă, germenii administraţi dispar şi în primele zile ei nu pot fi găsiţi nici chiar în ganglionii limfatici, dar, începînd cu a 5-a zi, culturile din ganglionii limfatici devin pozitive. Numărul germenilor în ganglioni creşte treptat, iar în a 10-a zi ei apar în sînge şi organe. Pătrunderea germenilor în organism este urmată deci de o fază de adaptare a lor la mediul tisular şi numită, din această cauză, *perioada criptobiotică*. O dată perioada criptobiotică trecută, germenii încep să se multiplice şi simptomele clinice îşi fac, consecutiv, apariţia.

Apariţia simptomelor este precedată deci de o perioadă de timp în care se desfăşoară, pe de o parte, forţele agresive ale germenului, iar, pe de altă parte, mijloacele de apărare ale gazdei. Simptomul clinic nu este şi nu trebuie considerat numai o urmare a acţiunii germenului, ci trebuie văzut în el şi reacţia organismului. Perioada de incubaţie este durata de timp în care cele două elemente antagoniste iau contact, pregătesc conflictul care se va desfăşura. Multe, probabil cele mai multe infecţii, se termină în perioada de incubaţie, în sensul că germenii sînt distruşi de organism înainte ca ei să poată produce vreo tulburare clinică perceptibilă. Zilnic, organismele animale şi umane distrug, de exemplu, stafilococii patogeni care se infiltrează în intimitatea ţesuturilor de pe piele sau de pe mucoasele pe care

Scanned with OKEN Scanner

ei, în mod obişnuit, se găsesc. In cazul în care germenii nu au putut fi distruşi la poarta de intrare sau în intimitatea ţesuturilor, se produce infecţia aparentă, în sensul că simptomele clinice îşi fac apariţia. *Procentul de morbiditate* exprimă tocmai numărul de indivizi îmbolnăviţi, raportat la numărul de inidivizi receptivi şi trăind în mediul infectat. Acest procent este foarte variabil de la o infecţie la alta. Morbiditatea, spre exemplu, este de 90—100% în pesta porcină, pesta aviară, agalaxia contagioasă, bruceloză, dar este foarte scăzută în unele infecţii virotice, cum sînt boala lui Aujeszky, poliomielita umană, unele encefalite etc. Populaţiile din zonele în care o infecţie are un caracter endemic, respectiv enzootic, dau un procent mai mic de morbiditate decît cele care se găsesc în afara zonei enzootice sau epizootice (endemice sau epidemice). Astfel, oamenii de culoare neagră sînt mai receptivi faţă de bacilul tuberculozei decît cei albi, iar oile din regiunile în care variola este enzootică dau un procent de morbiditate mai mic, în comparaţie cu cele care se găsesc în ţinuturi din care infecţia a dispărut de mult timp.

Perioada evolutivă este timpul care se scurge de la apariţia simptomelor şi pînă la dispariţia lor. Durata acestei perioade variază, la fel, în limite largi, atît de la o infecţie la alta, cît şi în cadrul aceleiaşi infecţii. Infecţia cărbunoasă, de exemplu, durează, în medie, cîteva zile, infecţia rabică 1—3 zile, infecţia morvoasă de la cîteva săptămîni la cîteva luni sau cîţiva ani etc. Tuberculoza la om sau animale poate evolua în cîteva săptămîni, dar ea poate dura luni, ani şi chiar zeci de ani. Unele infecţii au o evoluţie constantă pentru aceeaşi specie sau chiar pentru specii diferite. Astfel, turbarea evoluează, în medie, în 3 zile la toate animalele şi la om şi rareori această durată este depăşită.

Perioada finală. O infecţie poate sfîrşi cu moartea sau cu vindecarea. Fenomenele organice care preced moartea pot fi, pentru unele infecţii, caracteristice, pentru altele însă nu au nimic particular. Astfel, în unele infecţii, moartea este precedată de pierderea conştiinţei, în altele, dimpotrivă, bolnavul îşi păstrează pînă în ultima clipă luciditatea.

Procentul de mortalitate, adică proporţia în care cei îmbolnăviţi mor, variază de la o infecţie la alta. El este de exemplu, de 100% în turbare, de 90—100% în pesta aviară, pesta porcină, de 1—50% în variola ovină, variola porcină etc. Variaţii în ceea ce priveşte procentul de mortalitate se întîlnesc şi în cazul aceleiaşi infecţii şi ele sînt legate de rezistenţa organismelor. Procentul de mortalitate, ca şi cel de morbiditate, este mai redus la populaţiile în care boala este enzootică, decît la cele în care boala a dispărut de mult timp. Starea sistemului nervos influenţează procentul de mortalitate. In condiţii experimentale, Şt. Nicolau şi colaboratorii (1953) au arătat că la şobolanii care prezintă fenomene de inhibare a corticalităţii, prin administrarea de cloralhidrat şi a somnului reflex, procentul de mortalitate, produs prin inocularea virusului rabic fix, se reduce în raport cu animalele martore.

Vindecarea este momentul dispariţiei oricărui simptom clinic. Intre momentul vindecării şi cel al recîştigării integrităţii anatomice şi funcţionale există un timp numit *perioadă de convalescenţă.* Durata acestei perioade este, la fel, foarte variabilă. Sînt infecţii cu perioade lungi de convalescenţă şi sînt altele cu perioade scurte. Se mai observă că, în urma aceleiaşi infecţii, unele organisme se refac repede, altele foarte încet şi uneori incom-

Scanned with OKEN Scanner

plet, ceea ce de asemenea este în legătură cu starea sistemului nervos, cu modul de funcţionare a întregului organism.

Vindecarea poate fi însoţită de sterilizarea organismului, în sensul dispariţiei totale a germenilor patogeni, sau, dimpotrivă, vindecarea nu duce la distrugerea tuturor germenilor care au produs infecţia. In acest din urmă caz, organismul rămîne purtător şi, adeseori, eliminator de germeni. În febra tifoidă umană, de exemplu, *Salmonella typhosa* rămîne, după vindecare, localizată în vezica biliară, de unde se elimină prin fecale. De asemenea, în anemia infecţioasă a calului, animalele, o dată infectate, rămîn purtătoare de virus întreaga lor viaţă. Asemenea purtători de germeni se întîlnesc în foarte multe infecţii. Este de remarcat că, din acest punct de vedere, infecţiile se deosebesc unele de altele, în sensul că unele creează constant purtători, iar altele numai rareori.

Purtătorii au rol important în răspîndirea infecţiilor şi de aceea descoperirea şi neutralizarea lor preocupă într-o mare măsură epidemiologia si epizootologia.

CLASIFICAREA INFECŢIILOR

Problema clasificării infecţiilor, adică a încadrării tuturor infecţiilor într-o schemă generală, folosind un singur criteriu, a preocupat pe numeroşi cercetători, fără însă ca pînă în prezent să se fi ajuns la o soluţie unanim acceptată. Dată fiind complexitatea problemei, mulţi autori nu mai urmează, în diversele tratate, nici o clasificare, nici o ordine, tratînd infecţiile separat, una după alta, fără nici o succesiune şi legătură între ele. Alţii adoptă însă o ordine în tratarea diverselor infecţii. Criteriile pe care aceştia din urmă se sprijină în clasificarea infecţiilor variază : unii, luînd drept criteriu etiologia infecţiilor, adoptă o clasificare microbiologică, alţii epidemiologia lor şi dau o clasificare epidemiologică, alţii simptomatologia şi prezintă o clasificare clinică, în fine alţii se sprijină pe criterii mixte, dînd clasificări microbiologico-epidemiologice sau clinico-epidemiologice. Patrik, de exemplu, prezintă, în 1950, o **clasificare clinică,** împărţind bolile infecţioase în trei mari categorii şi anume :

1. boli infecţioase cu caracter septicemic şi fără localizări — febra tifoidă, scarlatina etc. ;
2. boli infecţioase cu localizări în anumite organe — difteria, hepatita epidemică etc. ;
3. boli infecţioase locale, neînsoţite de manifestări generale — piodermite, tricofiţii etc.

Gromaşevski (1949) adaptează o **clasificare epidemiologică,** împărţind toate infecţiile în patru mari grupe, şi anume :

1. infecţii intestinale — salmoneloza, holera etc. ;
2. infecţii respiratorii — poliomielita, gripa etc. ;
3. infecţii sanguine — malaria, tifosul exantematic etc. ;
4. infecţii tegumentare — turbarea, tetanosul etc.

Clasificarea microbiologică socotim că este cea mai justă, ea avînd cea mai mare valoare practică şi fiind cel mai mult de acord cu evoluţia cunoştinţelor noastre. Intr-adevăr, socotim că nici un diagnostic de boală infecţioasă nu se poate pune înainte de a preciza etiologia sa şi nici un tra-

Scanned with OKEN Scanner

tament nu se poate indica fără a cunoaşte agentul etiologic. Pînă la rezolvarea problemei clasificăriii infecţiilor noi dăm, în scopul mai ales de a preciza sensul unor termeni folosiţi în tratatele de boli infecţioase, mai multe scheme de clasificare, care se sprijină pe diverse criterii.

1. Privite din punct de vedere al naturii *agentului lor patogen,* infecţiile pot fi împărţite în :

a) *Viroze* — infecţii produse de virusuri, cum sînt pesta aviară, pesta porcină, turbarea, jigodia carnasierelor, poliomielita, rujeola, pojarul etc.

b) *Bacterioze* — infecţii produse de bacterii, cum sînt bruceloza, antraxul, tetanosul, cărbunele emfizematos, rujetul, tuberculoza etc.

c) *Rickettsioze* — infecţii produse de rickettsii, cum sînt tifosul exantematic, febra Q sau pulmonară, conjunctivita rumegătoarelor etc.

d) *Micoze* — infecţii produse de ciuperci, cum sînt tricofiţiile umane şi animale, aspergilozele umane şi animale, saprolegnioza peştilor, stahibotriotoxicoza cailor etc.

2. Privite din punct de vedere al *complexului lor etiologic,* infecţiile pot fi împărţite în :

a) *Primare* — infecţii care sînt rezultatul acţiunii unui singur germen patogen şi care acţionează independent de alţi factori morbigeni vii sau morţi. În această grupă intră pesta porcină, pesta aviară, antraxul, cărbunele emfizematos etc.

b) *Secundare* — infecţii care se suprapun peste o infecţie primară, care se dezvoltă într-un organism a cărui rezistenţă a fost diminuată, zdruncinată, printr-o infecţie primară. În acestă grupă intră infecţiile salmonelice şi pasteurelice care însoţesc sau succed pestei porcine, infecţiile streptococice, care însoţesc şi succed jigodiei carnasierelor, infecţiile care însoţesc şi se dezvoltă în leziunile tuberculoase etc.

c) *Condiţionate* — infecţii care se grefează pe stări morbide — avitaminoze, dezechilibru alimentar etc. de altă natură decît infecţioasă. În acest grup intră unele infecţii streptococice, colibacilozele etc.

d) *Asociate* — infecţii care sînt datorite acţiunii sinergice a mai multor microbi : gripa purceilor, de exemplu, se pare că se dezvoltă în urma acţiunii concomitente a virusului gripal şi a unei bacterii hemofilice.

3. Privite din punct de vedere al *tipului clinic* şi cel *anatomo-patologic,* infecţiile pot fi împărţite în :

a) *Locale* — infecţii care sînt localizate într-o regiune a corpului şi care nu alterează vizibil starea generală a organismului respectiv. Unele infecţii stafilococice, unele micoze sînt infecţii locale.

b) *Generale* — infecţii răspîndite în întregul organism: generalizarea infecţiei este de tip metastatic cînd constă din constituirea unor focare multiple şi răspîndite în multe ţesuturi şi este de tip septicemic cînd germenii se găsesc şi se răspîndesc în sînge. Generalizarea în tuberculoză este de tip metastatic, iar în antrax de tip septicemic. În primul caz germenii se găsesc numai în focar şi lipsesc, de regulă, din sînge şi ţesuturile care nu prezintă leziuni, în al doilea caz îi găsim în număr mare în sînge şi, în consecinţă, în toate ţesuturile şi organele. Bacteriemia este o noţiune similară cu septicemia, cu deosebirea că în septicemie numărul germenilor din sînge este mare şi poate fi pus în evidenţă prin metode obişnuite — frotiuri, culturi — în timp ce în bacteriemie numărul microbilor este redus şi nu poate fi pus în evidenţă decît prin însămînţări sau inoculări abundente.

Scanned with OKEN Scanner

c) *Aparente* — infecţii care se manifestă prin simptome clinice şi modificări anatomice decelabile prin mijloace obişnuite.

d) *Inaparente* sau *oculte* — infecţii în care nu apar simptome clinice. Prezenţa germenului în organism se poate totuşi pune în evidenţă fie prin metode directe — izolarea pe medii de cultură sau prin inoculări la animale — sau indirecte — punerea în evidenţă a anticorpilor specifici în serul sanguin. Se pot izola, de exemplu, salmonele de la animale sau oameni care n-au prezentat niciodată semnele unei infecţii salmonelice şi se pot găsi anticorpi antipoliomielitici la oamenii care nu au suferit niciodată de poliomielită. Infecţiile inaparente au o deosebită însemnătate în răspîndirea diverselor boli.

4. Privite din punct de vedere al *duratei perioadei lor evolutive,* infecţiile se împart în :

a) *Supraacute* — infecţii care durează foarte puţin timp şi se manifestă prin simptome foarte violente. Antraxul la oi, şi pasteureloza la găini durează de la cîteva ore pînă la 1 zi şi sînt deci infecţii supraacute.

b) *Acute* — infecţii cu o evoluţie de o durată ceva mai lungă ca cele supraacute. Antraxul la cal, bou este, de cele mai multe ori, o infecţie acută.

c) *Subacute* — infecţii cu o evoluţie încă şi mai lungă ca cele acute, cu manifestări clinice puţin intense. Antraxul la bou, pasteureloza bovină şi porcină pot evolua ca infecţii subacute. Termenul de subacut se referă atît la durata unei infecţii, cît şi la intensitatea manifestărilor clinice. O infecţie subacută nu se manifestă printr-o temperatură prea mare, tulburări violente în funcţionarea diverselor aparate etc.

d) *Cronice* — infecţii cu evoluţie înceată, prelungită în timp şi cu manifestări clinice de intensitate redusă. Tuberculoza la om şi la animale este, adeseori, o infecţie cronică care durează mult timp, ani şi chiar zeci de ani, dar se întîlnesc şi tuberculoze acute şi în special la tineret — uman sau animal. Morva, bruceloza sînt la fel infecţii cronice.

5. Privite din punct de vedere al *tipului de răspîndire* printre organismele speciilor receptive, infecţiile pot avea caracter :

a) *Sporadic* — cînd infecţia apare la indivizi izolaţi şi nu are nici o tendinţă de a se răspîndi la indivizii sănătoşi. Turbarea, tetanosul etc. sînt infecţii cu caracter sporadic.

b) *Enzootic* — cînd infecţia are o mică putere de răspîndire, ea cuprinzînd un număr restrîns de indivizi şi anume pe acei care se găsesc în contact intim şi prelungit cu individul bolnav sau cu izvorul de infecţie. Pasteureloza la bovine şi porcine, antraxul, cărbunele emfizematos au, în mod obişnuit, un caracter enzootic, ele evoluînd sub formă de focare izolate şi limitate la o gospodărie sau la un grup restrîns de gospodării agricole.

c) *Epizootic* — cînd infecţia are o putere mare de răspîndire şi, în consecinţă, ea poate cuprinde zone întinse, sate, regiuni, ţări. Pesta porcină, pesta aviară etc. au caracter epizootic.

d) *Panzootic* — cînd infecţia are o extraordinară putere de răspîndire, ea cuprinzînd toţi indivizii speciilor sensibile care se găsesc pe pămînt. S-au descris pandemii de ciumă şi holeră, la om, şi panzootii de febră aftoasă la animale. Germenii infecţiilor respective, plecînd iniţial dintr-un focar limitat, trec din individ receptiv în individ receptiv cu o mare vitează

și, în cele din urmă, îi infectează pe toți. Caracterul panzootic al unei infecții este legat de următorii factori principali :

— răspîndirea unei cantități mari de material virulent de către organismul infectat ; animalele bolnave de febră aftoasă, de exemplu, elimină cantități masive de virus prin salivă ;

— puterea de îmbolnăvire a materialului eliminat ; cantități infime de material virulent eliminat de un animal bolnav de febră aftoasă sînt capabile să infecteze un animal receptiv ;

— receptivitatea organismelor ; cu cît organismele sînt mai receptive, cu atît difuziunea unei boli se face mai repede ; în zonele în care pesta bovină, de exemplu, este enzootică, răspîndirea bolii se face mai încet, din cauză că animalele din focar opun o rezistență însemnată acțiunii patogene a virusului. Pesta bovină trecută însă în zone în care ea nu a bîntuit de zeci de ani și în care, în consecință, bovinele sînt foarte receptive, se va răspîndi cu mare repeziciune și va produce o mortalitate ridicată.

6. Privite din punct de vedere al *modului de transmitere,* infecțiile se împart în :

a) *Necontagioase* — cînd ele nu se transmit prin contact. Un cal bolnav de tetanos, un iepure bolnav de antrax, un bou bolnav de cărbune emfizematos pot cohabita cu animale receptive, adică sta cu ele în același grajd, în aceeași cușcă, fără ca infecția să se transmită. La fel, un cîine turbat nu poate transmite infecția sa altui animal dacă el nu poate mușca, dacă este prevăzut, de exemplu, cu o botniță. Infecțiile necontagioase au un caracter sporadic sau enzootic, dar niciodată epizootic.

b) *Contagioase* — cînd ele se transmit prin contact de la animalul bolnav la cel receptiv. Este suficient ca un porc bolnav de pestă porcină să pătrundă într-o crescătorie pentru ca toți porcii receptivi să se îmbolnăvească. La fel se întîmplă cu pesta aviară, febra aftoasă, bruceloza, tuberculoza, morva etc. Infecțiile contagioase pot avea caracter enzootic, epizootic sau panzootic.

c) *Transmisibile* — cînd ele se transmit prin înțepături de insecte. Unele din aceste infecții, cum sînt tifosul exantematic, malaria umană, piroplasmozele animale, unele encefalite etc., se transmit numai prin intermediul insectelor — păduchi, purici, țînțari, căpușe — altele se transmit prin insecte, dar și prin alte mijloace — contact, ingestii sau inhalații de material virulent etc. așa cum sînt burceloza, antraxul, tularemia etc. Primele infecții sînt obligatoriu transmisibile, cele din urmă facultativ transmisibile.

Agenții transmițători, la rîndul lor, pot fi purtători pasivi (agenți vectori) sau purtători activi (biologici sau gazde intermediare). Purtătorii pasivi duc contagiul, dar acesta nu se multiplică în organismul lor. Mușteie pot transmite infecția cărbunoasă, dar bacilul antraxului nu se multiplică în organismul lor. Dimpotrivă, în cazul purtătorilor activi sau gazdelor intermediare, agentul patogen trăiește în organismul receptiv, se multiplică în intimitatea țesuturilor sale, suferă aici unele stadii evolutive indispensabile dezvoltării sale și, mai mult încă, el se transmite prin ouă la urmași. O insectă infectată cu un virus, cu o rickettsie, poate face ouă infectate și insectele ieșite din aceste ouă sînt infectate și capabile să transmită infecția.

7. Infecțiile, privite din punct de vedere al *originii agentului infecțios,* pot fi clasificate în două grupe.

a) *Infecţii exogene,* care sînt produse de microbi ce se găsesc în mediul exterior, de unde, pătrunzînd în organism, provoacă starea de boală. Antraxul, tetanosul, gangrena gazoasă etc. sînt infecţii exogene.

b) *Infecţii endogene,* care sînt datorite unor microbi ce se pot găsi în organismul receptiv şi care, la un moment dat, prin intervenţia unor anumiţi factori, se răspîndesc din focarul latent în organism, producînd boala. Infecţia tuberculoasă poate avea, uneori, o origine endogenă, rezultînd din deşteptarea unor vechi focare tuberculoase.

IDENTIFICAREA NATURII INFECŢIOASE A UNEI STĂRI MORBIDE. POSTULATELE LUI KOCH

Insămînţările din cadavre permit, adeseori, izolarea diverselor specii bacteriene. Aceste specii astfel izolate sînt ele, în toate cazurile, agenţii cauzali ai stării morbide care s-a observat în timpul vieţii ? Desigur că nu. Intr-adevăr, reprezentanţii florei intestinale, cum sînt *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Clostridium perfringens, Cl. oedematis maligni* se găsesc şi se izolează frecvent din organe, mai ales cînd acestea nu sînt examinate imediat după moarte, dar aceşti germeni nu sînt decît rareori agenţii unor stări patologice.

Invazia cadavrelor de către diverse bacterii a dat naştere, la începutul erei bacteriologice, la numeroase confuzii cu privire la etiologia diverselor boli, unii oameni de laborator socotind că orice bacterie izolată dintr-un cadavru este cauza bolii şi morţii. Pentru a înlătura aceste confuzii, Robert Koch, în anii 1878 şi 1884, a formulat regulile care trebuie respectate atunci cînd se stabileşte natura infecţioasă a unei stări morbide. Aceste reguli sînt cunoscute sub numele de postulatele lui Koch şi, conform lor, un microb poate fi socotit agentul unei infecţii cînd :

1. germenul se găseşte în toate organismele care au prezentat aceeaşi stare morbidă şi prezenţa lui este legată de leziunile constatate ;
2. germenul este izolat în culturi pure şi menţinut în cultură pură mai multe generaţii ;
3. germenul izolat şi cultivat în laborator în stare pură reproduce în condiţii experimentale, o stare patologică care se aseamănă, pînă la identificare, cu infecţia naturală.

Aceste trei condiţii, cunoscute şi sub numele de triada sau postulatele lui Koch, nu se pot aplica în toate cazurile, în sensul că un germen poate fi considerat agentul unei infecţii, deşi nu s-au îndeplinit toate cele trei condiţii. Astfel se consideră că unii germeni sînt agenţii unor stări morbide umane, deşi nu s-a reprodus experimental boala pe om, dat fiind pericolul pe care îl prezintă germenul pentru om. La fel, unii germeni nu au putut fi cultivaţi şi văzuţi în ţesuturi — virusurile filtrabile, de exemplu — şi, cu toate acestea, îi considerăm ca agenţii bolilor respective.

Postulatele lui Koch sînt deci aplicabile, în primul rînd şi aproape în totalitatea lor, infecţiilor bacteriene ; dar chiar şi aici sînt abateri ; infecţiile bacteriene umane nu pot fi reproduse sub aceeaşi formă la animale (febra tifoidă, de exemplu).

Unele infecţii bacteriene animale de asemenea nu pot fi totdeauna reproduse ; astfel, sînt infecţia rujetică a porcilor dizenteriile anaerobe ale mie-

Scanned with OKEN Scanner

ilor etc. În aceste cazuri, se consideră totuși că bacilul rujetului și bacilul perfringens sînt agenții infecțiilor respective și această poziție se sprijină și pe constatarea că vaccinurile preparate din bacilii respectivi imunizează animalele față de infecția naturală, rujetică sau dizenterică. Cele trei postulate ale lui Koch ar putea fi completate cu un al patrulea și anume: un microb este considerat agentul unei infecții cînd vaccinul preparat din microbul respectiv imunizează organismele față de infecția naturală.

Pentru infecțiile de altă natură — viroze, rickettsioze — ne limităm, în determinarea relațiilor dintre boală și agentul etiologic, la îndeplinirea a uneia sau a două din cele trei condiții stipulate de Koch.

Scanned with OKEN Scanner

FACTORII CARE CONDIȚIONEAZĂ APARIȚIA UNEI INFECȚII

Apariția unei infecții este condiționată de existența următorilor factori principali :

A. germenul patogen

B. gazda receptivă.

Alături de acești factori esențiali și în absența cărora nu se poate dezvolta nici o infecție, mai există și alții care își au importanța lor, atît în apariția, cît și în evoluția unor infecții, dar nu a tuturor infecțiilor. Dintre acești factori vom cita, poarta de intrare, doza de germeni și realizarea transmiterii (transportului) germenilor din sediul lor natural pe sau în organismul receptiv.

Astfel, pentru infecțiile în mod obligatoriu transmisibile prezența gazdei intermediare este un factor esențial. Într-adevăr, în absența țînțarilor, un malaric poate locui ani de zile într-o regiune fără ca infecția să se poată transmite la alte organisme. La fel, un bolnav de tifos exantematic, fără păduchi, nu este periculos pentru oamenii din jur, o oaie cu piroplasmoză nu transmite, în absența căpușelor, boala sa oilor cu care vine în contact etc. Din aceste motive, zonele de extindere a infecțiilor obligatorii transmisibile sînt condiționate de aria geografică a gazdei intermediare.

Să examinăm factorii determinanți ai infecției și să vedem cum intervin și care este rolul fiecăruia în producerea procesului morbid.

GERMENUL PATOGEN

Se înțelege prin germen patogen orice microb capabil să producă, în condiții naturale, o infecție. Virusul rabic, *Bacillus anthracis, Brucella abortus* etc. sînt germeni patogeni.

ECOLOGIA GERMENILOR PATOGENI

Germenii patogeni, priviți în raport cu poziția pe care o ocupă față de organismul receptiv, pot fi împărțiți în trei grupe și anume :

1. paraziți obligatorii
2. paraziți condiționați sau epifiți
3. paraziți facultativi.

Paraziții obligatorii sînt germenii care se găsesc, în mod obișnuit, în organismul animal și care nu se multiplică și nu rezistă decît scurt timp în mediul ambiant. Virusul rabic, de exemplu, se găsește în organismul infectat și se transmite de la acest organism la altul sănătos prin mușcătură ; el nu rezistă decît puțin timp în mediul ambiant. La fel se comportă marea majoritate a virusurilor filtrabile, rickettsiilor, borrelomicetelor, precum și o serie întreagă de bacterii cum sînt bacilii morvei și tuberculozei, gonococul și meningococul etc.

Paraziții condiționați sau **epifiții** sînt acei germeni care, în mod obișnuit, se găsesc pe tegumente sau în tubul digestiv al omului și animalelor fără ca prin prezența lor să tulbure normala funcționare a organismului respectiv. Se admite, deși nu este pe deplin dovedit, că acești germeni nu iau și nu dau nimic organismului respectiv, ci îl folosesc numai ca suport mecanic și de aici numele de epifit ce le-a fost dat și care a fost împrumutat din botanică (mușchiul copacului este, de exemplu, o plantă epifită). Aceste raporturi de bună vecinătate, de neimixtiune se mențin atît timp cît macroorganismul își păstrează integritatea anatomică și funcțională. De îndată însă ce această integritate a fost alterată printr-o cauză oarecare — avitaminoze, infecții primare — acești germeni devin agresivi și dezvoltă procese patogene. În acest fel se comportă, în mod frecvent, *Pasteurella animalium,* unele specii din genul *Salmonella, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Shigella equirulis* etc. Germenii din acest grup produc, de cele mai multe ori, infecții cu caracter enzootic.

Paraziții facultativi sînt acei germeni care se găsesc și își au habitatul lor obișnuit în apă, pămînt, de unde accidental ajung în organismul animal și produc o stare patologică. Unii dintre acești germeni sînt foarte răspîndiți cum sînt : *Clostridium tetani, Cl. oedematis maligni, Cl. welchii* și chiar *Bacillus anthracis* etc. și, în consecință, contactul dintre organismele receptive și ei este foarte frecvent, dar infecțiile sînt cu toate acestea, relativ rare. Această particularitate se datorește faptului că acești germeni nu pot dezvolta un proces morbid decît în cazul cînd găsesc o poartă convenabilă de intrare în organism. În general, pătrunderea lor în mediile organice se face printr-o soluție de continuitate a învelișului extern.

ELEMENTELE PATOGENITĂȚII

Patogenitatea rezultă din structura morfofiziologică a unui germen. *Bacillus subtilis* și *B. anthracis,* bacilul tetanosului și bacilii pseudotetanici, bacilii difteriei și cei pseudodifterici, piococii și saprococii sînt foarte apropiați ca formă, caractere culturale etc. și, cu toate acestea, unii sînt patogeni și ceilalți nepatogeni. De ce bacilii difteriei sînt patogeni și cei pseudodifterici nu sînt, ce diferențe sînt între *B. anthracis* și *B. subtilis,* diferențe care fac ca primul să dezvolte o infecție foarte gravă, iar al doilea să fie un germen nevătămător sau cu alte cuvinte căror fapte își datorește un microb patogenitatea ? Răspunsul la această întrebare nu este simplu. Ceea ce se poate spune cu siguranță, în momentul de față, este că patogenitatea rezultă dintr-un complex de funcțiuni care, în mare măsură, sînt caracteristice fiecărei specii microbiene, în sensul că fiecare specie patogenă posedă

elemente proprii cu ajutorul cărora se infiltrează în organismul viu și dezvoltă procesul morbid. In această varietate de mijloace ale agresiunii microbiene, se pot recunoaște însă două grupe principale și anume: o grupă care asigură virulența, alta toxicitatea.

VIRULENȚA

Se înțelege prin virulență însușirea unui germen de a se multiplica în țesuturile vii.

ELEMENTELE VIRULENȚEI

Insușirea de a se multiplica în țesuturile vii nu se întîlnește la microbii saprofiți, care, de îndată ce pătrund în organism, sînt distruși de către sistemul defensiv al acestuia. Microbii virulenți se pot înmulți însă în țesuturile vii pentru că, spre deosebire de saprofiți, rezistă acțiunii destructive a sistemului defensiv normal al gazdei receptive. Această rezistență a microorganismului este o consecință a dotării sale cu anumite proprietăți particulare, în raport cu microbii saprofiți. Să examinăm cîteva din aceste proprietăți.

Streptococii patogeni, de exemplu, introduși în cavitatea peritoneală a iepurelui, se înconjoară de o capsulă care îi protejează față de leucocite. Intr-adevăr, în timp ce streptococii necapsulați sînt înglobați și digerați de leucocite, cei capsulați se multiplică în lichidul peritoneal, invadează organismul și îl omoară. Bacilii cărbunelui se comportă la fel. Sub forma capsulată, ei nu sînt niciodată fagocitați și cum capsularea se produce după cîteva minute de la venirea lor în contact cu umorile organismului, se înțelege de ce capsulogeneza are importante funcțiuni defensive pentru microbi. Stafilococii patogeni, după ultimele cercetări, își creează, o dată pătrunși în organism, un înveliș din însăși plasma gazdei; ei posedă un ferment care coagulează plasma din jurul lor și aceasta se depune pe suprafața germenului sub forma unui strat izolator între germen și organism. Se pare că astfel înveliți, mascați de această nouă uniformă, leucocitele nu-i mai recunosc ca elemente străine și nu-i mai fagocitează. Experimental, se constată că un stafilococ patogen produce la un animal tulburări cu atît mai grave, cu cît stafilococul infectant posedă un ferment coagulant mai activ pentru plasma speciei respective. Astfel, stafilococii patogeni pentru om ca și pentru unele specii animale nu coagulează plasma de bou, în timp ce stafilococii, izolați de la oaie, o coagulează. Inoculînd, la același bou, pe cale subcutanată, în două regiuni diferite, două tulpini de stafilococi, una de tip uman și alta de tip ovin, se constată că aceasta din urmă produce un abces de dimensiuni mult mai importante ca tulpina umană. Coagulabilitatea plasmei și funcțiunea protectoare exercitată de această proprietate intervin desigur în acest proces, căci cele două tulpini nu prezintă alte diferențe care ar putea să-l explice. Cele două feluri de tulpini sînt, într-adevăr, egal de patogene pentru iepure și nu se constată nici o diferență în modul lor de comportare față de plasma acestui animal.

Capsula constituită de stafilococi din plasma coagulată împiedică fagocitoza și deci permite germenului să se multiplice în țesuturile vii. Protecția,

în aceste cazuri, pare mai mult de natură mecanică. Germenii au însă și alte mijloace pe care le-am putea numi de natură chimică și care îi pot apăra de leucocite. Unii germeni virulenți secretă, de exemplu, substanțe antifagocitare. Stafilococul piogen pune în libertate, in vivo, un principiu cunoscut sub numele de leucocidină, care distruge, lizează leucocitele. Un asemenea principiu a fost identificat și la alți germeni, în special la streptococi. Substanțele de natură glucido-lipidică care au fost identificate de Boivin și Mesrobeanu la o serie de bacterii Gram negative paralizează posibilitățile de orientare ale leucocitelor, împiedică diapedeza, adică trecerea leucocitelor din vase în țesuturile invadate și deci desfășurarea proceselor defensive.

Unii germeni patogeni se pot apăra față de activitatea antimicrobiană a umorilor printr-un mecanism încă neprecizat. Bordet și Renaux (1932) examinînd din acest punct de vedere două tulpini de colibacili, una patogenă și alta lipsită de patogenitate, constată că prima rezistă la acțiunea litică a alexinei, în timp ce tulpina nevirulentă este lizată de acest principiu. Alți germeni se comportă ca și colibacilii virulenți, adică rezistă la acțiunea litică a alexinei. Virusurile filtrabile se multiplică în organism și anume în interiorul celulelor, dar nu se cunosc mijloacele de care dispun pentru a se apăra de leucocite, de principii antiinfecțioși din umori, de fermenții celulari etc.

DISTINCȚIA DINTRE VIRULENȚĂ ȘI TOXICITATE

Virulența, capacitatea de multiplicare in vivo, nu este o însușire a tuturor microbilor patogeni, în sensul că nu toți microbii patogeni sînt a fortiori și virulenți. Bacilul tetanosului este patogen, dar nu este virulent, activitatea sa patogenă fiind exclusiv datorită toxicității sale. Intr-adevăr, el pătrunde și se multiplică în țesuturile mortificate dintr-o plagă, pune în libertate toxine care se absorb în organism și produc boala, dar germenul rămîne localizat în plagă, neinvadînd, decît excepțional, țesuturile vii din jur. Pe de altă parte, se constată că filtratul unei culturi de bacili ai tetanosului, lipsit de orice germen viu, produce aceeași boală ca și cultura integrală, ceea ce constituie o nouă dovadă că secrețiile toxice ale bacilului și nu bacilul însuși sînt răspunzătoare de întregul tablou morbid. In totală opoziție cu bacilul tetanosului stă bacilul cărbunelui. Acesta, introdus în organism, se înmulțește întîi la locul de inoculare și apoi invadează și se multiplică în organele interne care, în momentul morții, conțin cantități enorme de germeni. Splina unui bou mort de antrax este un sac de germeni, greutatea bacililor reprezentînd, după A. Popovici (1950), 9% din greutatea totală a organului. Prezența unui număr așa de mare de germeni în intimitatea țesuturilor nu poate fi compatibilă cu viața. Germenii, atît prin substanțele nutritive, în special oxigenul, pe care le iau organismului, cît și prin produșii de dezasimilație pe care îi varsă în umori, tulbură profund fiziologia organismului, provocîndu-i moartea. Procesul morbid și moartea sînt datorite virulenței bacililor, faptului că ei s-au înmulțit într-un număr așa de mare în organism și nu toxinelor, cu acțiune specifică, pe care germenul le-ar elibera.

Asemenea toxine se pare că lipsesc cu desăvîrșire la bacilul cărbunelui. Intr-adevăr, bacilii morți, injectați în doze rezonabile, sînt lipsiți de noci-

Scanned with OKEN Scanner

vitate. In asemenea condiții, nu se poate vorbi despre toxicitate la acest bacil. În cursul infecției intervin, foarte probabil, procese toxice datorite componenților chimici ai celulei microbiene, în special ai celor de natură proteică, ceea ce nu este de mirare. Intr-adevăr, orice proteină constituie un toxic pentru organismul animal care nu conține proteina considerată. Serul sanguin de bou este toxic pentru cîine, cel de cîine pentru iepure și așa mai departe. In consecință, orice proteină microbiană, indiferent dacă microbul care o conține este patogen sau nu, exercită o acțiune toxică pentru organismele animale. Toxicitatea proteinelor izolate de la bacterii saprofite este de altfel remarcabilă. Este de presupus că microbii nu produc tulburări numai prin simpla lor prezență în organism. Particulele inerte avînd dimensiuni apropiate de ale bacteriilor nu provoacă, într-adevăr, nimic asemănător unei infecții. Dacă bacteriile produc tulburări funcționale și anatomice, acestea sînt datorite acțiunii unor principii chimici scoși sau introduși din sau în organism. Acești principii nu pot primi numele de toxine, pentru că, în afara prezenței germenilor, ei sînt lipsiți de orice nocivitate. Trebuie să diferențiem însă această toxicitate legată de natura proteică a unei substanțe, de toxicitatea specifică a unor produși microbieni. Produșii din urmă sînt activi în doze foarte mici, au afinitate pentru anumite țesuturi și produc tulburări caracteristice fiecărui produs. Toxina tetanică, toxina difterică și toxina botulinică sînt de natură proteică, dar afinitățile tisulare ale fiecărei toxine sînt diferite și, în consecință, simptomele produse sînt proprii fiecăreia din ele. Toxina tetanică produce, de exemplu, o excitație a celulelor nervilor motori, ceea ce se traduce, clinic, prin contracția mușchilor striați, dependenți de celulele motorii pe care s-a fixat toxina. Toxina botulinică produce, de regulă, o paralizie oculară și faringiană. Manifestările morbide depind de originea toxinei, de natura ei și aceasta constituie specificitatea de acțiune a unor asemenea produși.

Bacilii tetanosului, botulismului, difteriei sînt exclusiv toxigeni, iar bacilii cărbunelui, rujetului și virusurile filtrabile sînt exclusiv virulenți. Primii sînt patogeni pentru că pun în libertate toxine, cei din urmă pentru că se multiplică in vivo. Primii acționează numai prin toxinele lor, cei din urmă, mai ales, prin prezența lor. Filtratele celor dintîi produc aceleași simptome ca și germenii înșiși, filtratele lipsite de germeni ale celor din urmă sînt total lipsite de orice activitate vătămătoare.

Intre microbii exclusiv virulenți și exclusiv toxigeni există o serie de microorganisme la care virulența și toxicitatea concură la realizarea procesului infecțios. La unii dintre aceștia predomină virulența, la alții toxicitatea, la alții, în fine, cele două funcțiuni sînt în mod egal reprezentate și au aceeași valoare în producerea procesului morbid.

Puterea patogenă, mai ales la unii germeni, se pierde foarte repede — după cîteva treceri pe mediile de cultură — ceea ce înseamnă că ea (puterea patogenă) este în legătură cu unele funcțiuni neesențiale pentru celula respectivă (celula care și-a pierdut patogenitatea se multiplică in vitro tot așa de energic și poate încă și mai energic ca cea patogenă), funcțiuni care ocupă o poziție superficială, funcțiuni create ad hoc în anumite scopuri și anume în scopul de a se putea multiplica în umorile unui anumit organism. Aceste funcțiuni nu sînt, în cazul unor asemenea bacterii, solid ancorate în substratul ereditar al speciei și ele par a fi reprezentate printr-un fel de fermenți adaptivi. Alte bacterii, la care probabil funcțiunile de patogeni-

Scanned with OKEN Scanner

tate sînt de o mai veche apariție — *Bacillus tuberculosis,* de exemplu — puterea patogenă se pierde mai greu, dar totuși se poate pierde.

TOXICITATEA ȘI TOXINELE MICROBIENE

Toxicitatea este proprietatea unui germen de a provoca tulburări la animale prin secrețiile sau substanțele sale componente, fără intervenția germenului viu. Un germen patogen este socotit deci toxic cînd filtratul culturilor sale sau corpii microbieni omoriți produc, în doze relativ mici, tulburări manifeste la animale și este socotit netoxic cînd aceste materiale sînt suportate, în doze rezonabile, de animale.

Substanțe nocive pentru organismul uman și animal se găsesc la diverse specii din regnul animal sau vegetal. Unele specii de șerpi, de exemplu, secretă otrăvuri foarte active pe care le pot introduce în țesuturile animale prin mușcătură. Creierul de găină este toxic pentru găină și administrat pe cale intravenoasă o omoară în timp scurt, 1—2 minute (Popovici și Solnitzky, 1955). Toxicitatea creierului pare a fi datorită trombochinazelor conținute de țesuturile respective. In structura tisulară a numeroaselor plante se găsesc substanțe toxice care sînt active chiar pe cale bucală. Otrava ricinului este, dintre acestea, cea mai binecunoscută. Speciile bacteriene saprofite, în special cele de putrefacție, transformă unele materii proteice pe care le fermentează în produși toxici, care au fost cercetați, de altfel, de mult timp (Panum, 1856, Neneki, 1876) și care sînt cunoscuți sub numele de ptomaine. Asemenea substanțe nu sînt specifice unei specii bacteriene, căci ele pot lua naștere în urma acțiunii fermentative a numeroase specii bacteriene.

Unele specii patogene se caracterizează, printre altele, prin aceea că pun în libertate sau conțin substanțe toxice. Cercetările, în această privință, începute de Roux și Yersin, în 1888, continuă și astăzi, fără a se fi putut identifica produșii toxici ai tuturor speciilor bacteriene patogene. Această identificare este de cea mai mare importanță din punct de vedere practic. Cunoscînd echipamentul toxic al unui germen și modul de acțiune al fiecărui component al acestui echipament, se ajunge la cunoașterea mecanismului de acțiune a germenului și se pot lua, în aceste condiții, măsuri raționale de combatere. Fără cunoașterea toxinei difterice nu s-ar fi ajuns, de exemplu, la prepararea serului antidifteric, care, de la descoperirea sa (1890) și pînă acuma, a salvat atîtea vieți omenești.

Roux și Yersin (1888) observă că filtratul, liber de orice germen, viu sau mort, al unei culturi de bacili ai difteriei, este extrem de toxic pentru unele animale de laborator, în special pentru cobai. Această importantă descoperire a fost urmată, în scurt timp, de altele, dovedindu-se că multe specii bacteriene pun în libertate, în mediile de cultură în care se dezvoltă, produși toxici, Astfel, Faber (1890) arată că filtratele culturilor de bacili ai tetanosului au aceeași toxicitate și produc aceeași boală ca și cultura integrală de bacili ai tetanosului, iar Ermengen descoperă, în 1895, toxina bacilului botulinic.

Pfeiffer și Bessau, ocupîndu-se de patogenia febrei tifoide umane, constată însă că filtratele, obținute din culturile în bulion de *Salmonella typhosa* (agentul etiologic al bolii), sînt lipsite, în doze mici, de nocivitate, pentru animalele de experiență, deși infecția naturală are caracterul unei intoxicații. Observații similare s-au făcut și asupra altor bacterii

Gram-negative — colibacili, pasteurele, salmonele etc. S-a putut însă constata că aceste bacterii, al căror filtrat este inactiv sau puțin activ, conțin totuși substanțe toxice, dar acestea nu se pun în libertate decît dezintegrînd celula bacteriană printr-un procedeu fizic, chimic sau biologic. Produșii toxici nu apar deci, în acest caz, ca substanțe de secreție, ci ei sînt componenți ai celulei bacteriene.

Toxicitatea bacteriilor poate fi datorită, deci, fie unui produs pus în libertate de celula microbiană în cursul multiplicării sale in vivo sau in vitro, fie unui compus chimic care face parte integrantă din celula bacteriană și care nu se eliberează decît prin dezintegrarea celulei. Unele toxine bacteriene sînt deci produse de eliminare, altele de constituție. Primele au fost numite exotoxine, cele din urmă endotoxine.

Exotoxinele așa cum se vede în tabelul 34 se deosebesc de endotoxine și prin alte proprietăți decît cele care privesc originea și modul lor de producție.

Tabelul 34

Proprietățile exotoxinelor și endotoxinelor

Exotoxine	Endotoxine
1. Sînt de natură proteică	1. Pot avea și altă natură decît proteică
2. Termolabile	2. Termostabile
3. Sînt transformate prin formol în produși netoxici, dar antigenici (anatoxine).	3. Nu sînt sensibile la formol și nu se transformă în anatoxine.
4. Active de cele mai multe ori în doze foarte mici și produc tulburări specifice	4. Active, în general, în doze mai mari ca exotoxinele și tulburările produse nu sînt specifice endotoxinei fiecărui germen.
5. Buni antigeni. Produc cantități importante de anticorpi și deci o imunitate solidă cînd sînt injectate la animale	5. Sînt lipsite parțial sau total de antigenitate. Produc imunitate slabă sau de loc

Unele specii bacteriene secretă numai exotoxine. Altele, dimpotrivă, nu pun în libertate toxine solubile și conțin numai endotoxine. Altele, în fine, conțin, printre componenții lor celulari, unii produși toxici (endotoxine), secretînd în același timp și exotoxine. Bacilii dizenteriei de exemplu fac parte din această din urmă grupă. Ei secretă o exotoxină neurotropă și conțin o endotoxină enterotropă.

EXOTOXINELE

Preparare. Exotoxinele sau toxinele difuzibile se secretă ori de cîte ori germenul respectiv se multiplică, dar ele se găsesc în cantități însemnate în mediile de cultură lichide, de unde, în mod obișnuit, se separă și se purifică. Separarea toxinelor de germeni producători se face fie prin filtrare, fie prin centrifugare. Filtrarea este folosită pentru separarea acelor toxine care nu pierd sensibil activitatea lor prin această operațiune, iar centrifugarea pentru cele care pierd parțial patogenitatea prin filtrare. To-

Scanned with OKEN Scanner

xina bacilului tetanosului, de exemplu, se separă prin filtrare, iar toxinele anaerobilor care produc gangrenele gazoase, prin centrifugare. Operația de centrifugare nu elimină total germenii din mediu, dar, pentru scopurile la care se folosesc aceste toxine — prepararea și titrarea serurilor imune — această eliminare nu este necesară.

Bogăția unui filtrat în principii toxici prezintă o deosebită importanță în practica preparării serurilor și vaccinurilor și de aceea în laboratoare se urmărește obținerea unor lichide cît mai bogate în asemenea principii. Această bogăție este condiționată de o serie de factori cum sînt tulpina, mediul de cultură, condițiile și timpul de incubație, momentul filtrării sau centrifugării etc. Astfel, tulpinile diverselor specii toxigene nu produc, în condiții egale, aceeași cantitate de toxine și alegerea unei tulpini este prima problemă care trebuie rezolvată în cadrul laboratoarelor însărcinate să fabrice toxine. Asemenea tulpini nu se iau la întîmplare. Prepararea toxinei difterice, de exemplu, se face în aproape toate biofabricile din lume, folosind o singură tulpină. La fel, pentru fabricarea toxinei tetanice se folosește, în momentul de față, un număr redus de tulpini și într-un institut, de regulă, este folosită o singură tulpină. Alegerea tulpinii nu constituie singura dificultate. Tulpina aleasă trebuie păstrată în condiții care să nu altereze capacitatea ei toxigenă și, mai mult încă, prin operații de selecție trebuie separate variantele care mențin toxinogeneza inițială. Germenii gangrenelor gazoase prezintă o însemnată variabilitate în ceea ce privește toxinogeneza, și deci și aici alegerea tulpinii este de primă importanță. Este de semnalat că în cazul speciei *Bacillus perfringens* se constată, chiar pentru aceeași tulpină, variații, mai ales în raport cu mediul de cultură folosit, atît în ceea ce privește cantitatea de principii toxici secretați, cît și în ceea ce privește calitatea lor. Acest bacil secretă, într-adevăr, un mănunchi de fracțiuni toxice notate cu literele grecești α, β, γ, etc. și se constată că în unele medii una din aceste fracțiuni poate lipsi, ceea ce poate avea consecințe neplăcute — accidente — în cursul hiperimunizării animalelor donatoare de ser.

Pe lîngă tulpină, felul culturii însămînțate, adică cultura în bulion, cultura pe agar, vechimea culturii etc., influențează toxinogeneza. Pentru bacilul tetanosului, de exemplu, unii experimentatori recomandă folosirea, pentru însămînțare, a culturilor vechi pe geloză Veillon.

Mediul de cultură, adică felul cărnii folosite la prepararea sa, felul peptonei adăugate, pH-ul etc. influențează toxinogeneza într-o măsură însemnată, și nerespectarea indicațiilor recomandate poate compromite producerea toxinei bacililor tetanosului sau difteriei într-o biofabrică. Importanță similară o au durata incubației și temperatura la care se face incubația.

Mecanismul formării exotoxinelor. Originea și modul de formare a exotoxinelor nu sînt încă complet lămurite. Roux și Yersin socoteau toxina bacilului difteriei un produs de natură enzimatică secretat de bacili în cursul multiplicării lor. Toxina ar lua deci naștere în celula bacteriană și s-ar elimina, ca atare, în mediul extern, constituind un produs de excreție. Această ipoteză a fost infirmată de o serie de observații. Astfel, nu se constată, în toate cazurile, o strînsă legătură între cantitatea de germeni dintr-o cultură și bogăția filtratului respectiv în produși toxici ; germenii deci se pot multiplica fără să secrete toxina, ceea ce nu s-ar întîmpla dacă toxina ar

fi un produs de excreție. W a l b u m constată, pe de altă parte și în același sens, că prezența albumozelor în mediile de cultură este absolut necesară producției de toxine. Într-adevăr, însămînțînd o tulpină toxigenă de bacili ai difteriei, pe de o parte, în bulion cu peptonă descompusă, prin tripsină, în aminoacizi, iar, pe de altă parte, în același bulion, însă care conține peptonă integrală nedescompusă, se constată că bacilii s-au multiplicat în ambele medii, dar cel din urmă a permis formarea unei cantități mai mari de toxină.

Această observație dovedește că toxina nu se produce decît în mediile care conțin albumoze complexe ; ea nu este deci un produs final de dezintegrare a protidelor, ci unul reprezentînd o primă etapă a procesului proteolitic și ea nu poate lua naștere din produșii simpli ai digestiei triptice. În concepția autorului, bacilii toxigeni nu secretă, în mediul de cultură, toxina propriu-zisă, ci numai un produs capabil să se transforme în toxină sub influența unor substanțe care se găsesc în mediu. În acest sens, el observă că un filtrat toxic își mărește toxicitatea cînd este amestecat cu o soluție de peptonă, bulion, ser etc. Produsul secretat de bacil — protoxina — ar fi constituit dintr-un ferment numit difteriotoxinază sau tetanotoxinază, după cum este pus în libertate de bacilii difteriei sau tetanosului. Autorul reprezintă schematic producția de toxină în felul următor :

1. Albumoze (netoxice) *prin enzimele proteolitice* ale bacililor difteriei sau tetanosului rezultă :

2. Produs intermediar (toxic) care *prin enzimele proteolitice* ale bacililor difteriei sau tetanosului se transformă în compuși simpli de dezagregare — aminoacizi — netoxici.

Producția de toxină, după această schemă, nu este un proces static, ci unul în continuă evoluție. Toxina ce se formează prin acțiunea unei enzime și se dezintegrează sub acțiunea altei enzime. Aceste procese de constituire și dezintegrare explică variațiile în concentrația de toxină ale filtratelor obținute din culturile bacteriilor toxice.

Proteinele și fermenții proteolitici iau parte activă în procesul de formare a toxinei, dar între fermenții proteolitici și producția de toxine nu este însă o legătură strînsă, în sensul că nu totdeauna tulpinile proteolitice sînt activ toxigene. Tulpini bune producătoare de toxine pot fi, de exemplu, slab proteolitice și invers.

Purificarea toxinelor. Exotoxinele bacteriene pot fi precipitate, și, în acest fel, separate de diverșii constituenți ai mediului de cultură și deci purificate. Precipitarea permite, pe lîngă purificarea toxinei, și o concentrare a sa. În plus, toxina precipitată poate fi uscată și, sub formă de pulbere, ea își conservă un timp mai îndelungat aceeași activitate toxică, ceea ce prezintă o deosebită importanță în titrarea serurilor și toxinelor.

Precipitarea exotoxinelor din mediile lichide de cultură se poate realiza prin diverse metode.

Precipitarea cu sulfat de amoniu este larg folosită în biofabrici atît pentru concentrarea toxinelor, cît și a anticorpilor dintr-un ser. Principial, metoda se sprijină pe constatarea că proteinele precipită în soluții saturate de sulfat de amoniu. În consecință, adăugînd unui filtrat dintr-o cultură în bulion de bacili ai tetanosului, difteriei, botulismului etc. cristale de sulfat de amoniu pînă la constituirea unei soluții saturate, toxina din filtrat va precipita și se va ridica la suprafața lichidului. De aici ea se culege cu o lingură sau se separă prin centrifugare. Precipitatul se poate redizolva în apă ușor alcalină,

Scanned with OKEN Scanner

de unde din nou se poate precipita, obţinîndu-se astfel un produs din ce în ce mai pur. Precipitatul final se poate usca sau se poate folosi ca atare. Şi într-un caz şi în altul este necesar ca sulfatul de amoniu să fie eliminat din soluţie, ceea ce se relizează prin dializă în saci de celofan faţă de apa din robinet. Dializa trebuie prelungită timp de 4—5 zile.

Precipitarea prin acid tricloracetic a fost introdusă, în purificarea toxinelor, de A. Boivin (1936) şi de Izard (1937). Metoda se sprijină pe constatarea, făcută de numeroşi cercetători şi după care exotoxinele, ca orice materie proteică precipită în mediul acid. Glenny şi Walpole (1915), Watson şi Wallace (1924) au folosit, în scopul acidifierii mediului, acidul clorhidric sau acetic. Boivin a introdus acidul tricloracetic. In scopul precipitării principiului toxic, filtratul culturii este acidifiat, prin adăugare de cristale de acid tricloracetic, pînă la pH=3,5. Se constituie, în aceste condiţii, un precipitat care se separă prin centrifugare rapidă şi care se redizolvă în soluţii uşor alcaline de bicarbonaţi sau fosfaţi. Metoda a fost aplicată în Institutul Cantacuzino pentru purificarea toxinelor bacililor difteriei şi tetanosului, obţinîndu-se, cu ajutorul ei peste 90% din produsul iniţial prezent în filtrat.

Metoda precipitării cu acid tricloracetic a fost îmbunătăţită de Mesrobeanu şi Mitrică (Combiescu C. şi col., 1952). Aceşti autori constată că rezultatele sînt mai bune cînd imediat după acidifierea lichidului toxic se adaugă, peste amestec, două volume de acetonă sau alcool. Se obţine, în acest fel, o recuperare mai completă a produsului toxic din soluţie.

Natura chimică. Exotoxinele sînt de natură proteică. Unii autori afirmă că ele sînt albumoze, deoarece filtrează prin pergament, filtru impermeabil pentru moleculele de proteină, dar nu trec prin sacii de colodiu, care sînt permeabili numai pentru aminoacizi.

Natura proteică a exotoxinei difteriei a putut fi mai îndeaproape studiată datorită faptului că germenul respectiv a putut fi cultivat în medii sintetice, în care izvorul de azot era constituit din diverşi aminoacizi. În aceste condiţii, bacilul secretă toxina specifică activă. Aceasta este precipitată din filtrat prin acidifiere la pH = 3,8 — 4,2 sau prin sulfat de amoniu. Variind pH-ul astfel ca să se obţină întîi solubilizarea şi apoi precipitarea unor proteine, se pot elimina unele fracţiuni netoxice, izolîndu-se un produs purificat extrem de activ, doza minimă mortală pentru 1 kg de cobai fiind de 0,000 000 4 g.

Acest produs nu conţine hidraţi de carbon sau pigmenţi; el dă toate reacţiile substanţelor proteice. Floculează, parţial, la pH = 4. Prin hidroliză s-au putut determina aminoacizi care fac parte din compoziţia produsului şi procentul în care aceşti aminoacizi se găsesc :

cistidină	2,3 %
arginină	3,8 %
lizină	5,3 %
triptofan	1,14%
tirozină	9,0 %

Greutatea atomică a moleculei toxice este de 72 000.

Titrarea toxinelor se poate face in vivo şi in vitro.

Pentru titrarea in vivo se folosesc animale de experienţă. Specia şi calea de inoculare folosită variază de la o toxină la alta. Astfel, pentru titrarea toxinei bacilului difteriei se folosesc cobai tineri în greutate de 250 g, iar produsul se injectează pe cale subcutanată. Pentru titrarea toxinei baci-

Scanned with OKEN Scanner

lului tetanosului, se pot folosi șoareci sau cobai, produsul inoculîndu-se tot pe cale subcutanată; pentru toxina speciei *Bacillus perfringens* se întrebuințează șoareci, iar toxina se administrează pe cale intravenoasă etc. Doza minimă mortală se exprimă în volume cînd se folosește toxină lichidă, neprecipitată și în greutate, cînd, dimpotrivă, animalele se injectează cu soluții din produsul precipitat și uscat. Doza minimă toxică variază, în limite foarte largi, de la toxina unei specii la alta și, în cadrul aceleiași specii, de la o tulpină la alta, iar pentru aceeași tulpină, de la o variantă la alta. Titrul maxim, pentru toxina lichidă, este în medie de 0,000 25 ml pentru toxina bacilului difteriei și cobai, de 0,000 002—0,000 000 1 ml pentru toxina tetanică și pentru șoarece, de 0,005—0,000 2 ml pentru toxina speciei *Bacillus perfringens* și tot pentru șoarece.

Titrarea în vitro se face prin metoda floculării în raport cu un ser antitoxic cunoscut și se exprimă în unități floculante.

Atenuarea și distrugerea exotoxinelor, dată fiind labilitatea lor, se pot face prin multiple mijloace. Temperatura de 60°C distruge, în scurt timp, cele mai multe exotoxine. Temperatura de 40°C nu le influențează decît foarte puțin; această temperatură asociată însă cu formolul răpește, în cîteva săptămîni, activitatea lor toxică. Filtratele astfel dezintoxicate, cunoscute sub numele de toxoizi sau anatoxine (nume dat de Ramon la sugestia Marietei Pompilian), pot fi cu succes folosite în imunizarea animalelor.

Dezintoxicarea se face, în condiții optime, la o concentrație de 0,3—0,5 formalină și la temperatura de 40°C; aceeași concentrație de formol este inactivă la 0°C; mărind însă concentrația formolului transformarea toxinei în anatoxină se poate face chiar la 0°C.

Exotoxinele se alterează în medii prea acide sau prea alcaline. Ionescu Mihăești și A. Dîmboviceanu (1928) au stabilit, pentru toxina bacilului difteriei, existența unor anumite zone de aciditate sau alcalinitate în care toxina este cel mai puțin alterată, chiar printr-un contact de 24 de ore. Aceste zone sînt pH = 5,7—5,9 pentru zona acidă și pH = 9—9,4 pentru zona alcalină. Toxina se distruge însă total sau aproape total în 24 de ore la pH = 4,5—5,35 în zona acidă și pH = 9,4—11,1 în zona alcalină.

Substanțele oxidante ca apa oxigenată și hipermanganatul de potasiu au o acțiune nocivă asupra toxinelor. Enzimele proteolitice dezintegrează și distrug moleculele de toxină. Bila, soluțiile colorante (violetul de gențiana) atenuează toxinele. Prin filtrare, titrul unor toxine scade datorită fenomenelor de adsorbție. Vibrațiile ultrasonore inactivează unele exotoxine, cum este, de exemplu, toxina bacilului difteriei. Exotoxinele rezistă la presiuni înalte și nu pot fi distruse, în mod sigur, decît la o presiune de 19 000 atmosfere. Rezistă la 9 000 atmosfere.

ENDOTOXINELE

Endotoxinele au putut fi extrase din celulele bacteriene prin metode foarte variate. Astfel, înghețarea la temperaturi foarte scăzute (aer lichid) și dezghețarea consecutivă, triturarea cu sare a corpilor bacterieni au fost printre primele metode întrebuințate și ele au permis izolarea unor componente toxice. Mai tîrziu, s-a recurs la metode chimice sau biologice. Boivin și Mesrobeanu (1933), folosind acidul tricloracetic, obțin din bacteriile Gram negative, o fracțiune toxică, care, din punct de vedere chimic este o

glucido-lipido-polipeptidă. Dintre factorii biologici, capabili să elibereze constituenţii toxici, citǎm bacteriofagul, fermenţii leucocitari, tripsina, antibioticele etc. Vibraţiile ultrasonore au fost şi ele întrebuinţate, în ultimul timp, ca factor fizic de dezintegrare a celulei microbiene.

Studiul sistematic al endotoxinelor a început o dată cu introducerea procedeelor chimice de izolare şi purificare, procedee care au permis identificarea chimică a unor compuşi toxici de natură endogenă. Dintre aceşti diverşi produşi doi merită o atenţie particulară şi anume: compusul glucido-lipido-polipeptidic şi compusul nucleoproteidic. Ambii se găsesc în soma bacteriilor Gram negative, mai cu seamă la speciile din genurile *Salmonella* şi *Escherichia* şi sînt în mare parte, răspunzători de tulburările care însoţesc infecţiile respective.

Complexul glucido-lipidic. Acest complex a fost identificat în soma bacteriilor Gram negative şi, în primul rînd, în soma speciilor din genurile *Salmonella* şi *Escherichia* şi apoi în soma altor specii Gram negative.

Izolarea. (Metoda Bovin-Mesrobeanu). Bacteriile se cultivă pe agar. Suspensiile în apă distilată, obţinute din aceste culturi, se tratează cu acid tricloracetic în proporţie de 5%. Amestecul rămîne 10—20 ore la rece, în care timp se agită de cîteva ori. Apoi se centrifughează şi în lichidul obţinut, lipsit practic de corpi bacterieni, se găseşte complexul glucido-lipidic. El se purifică prin precipitări în mediul alcoolic, la o reacţie alcalină, şi solubilizări, în apă uşor acidă, în care dă o soluţie uşor opalescentă. Dializa permite, la fel, eliminarea substanţelor cristalizabile şi purificarea complexului.

Proprietăţi fizico-chimice. Complexul constituie, în medie, 10% din greutatea uscată a bacteriilor. Este format din molecule mari şi, din această cauză, nu traversează membranele de colodiu, nu ultrafiltrează. Nu dă reacţiile proteinelor. Conţine C, H, N, P şi alte elemente. Rezistă în soluţie neutră timp de 1 oră, la 100°C. In mediu acid (1 ml de acid acetic n/5 pentru 100 ml de soluţie), la aceeaşi temperatură şi printr-o încălzire de 2 ore sau mai mult (pentru complexul obţinut din bacilii tifosului încălzirea se face timp de 30 de ore), complexul se desface într-o fracţiune glucidică şi alta lipidică (Boivin şi Mesrobeanu). Alţi cercetători au obţinut şi o fracţiune polipeptidică. Lipidele complexului, scindate prin hidroliză acidă, se insolubilizează şi se separă prin trecere prin hîrtie de filtru, polizaharidul rămînînd în soluţie.

Lipidele reprezintă, pentru complexul bacililor tifosului, 29% sau mai puţin. Ele conţin 73—74% carbon şi 12—13% hidrogen (Soru şi Combiescu, 1938).

Fracţiunea glucidică singură este lipsită de antigenitate şi de toxicitate, dar ea conferă specificitatea complexului.

Proprietăţi biologice. Complexul glucido-lipidic este toxic pentru animalele de experienţă. Doza minimă letală este, în medie, de 0,1 mg pentru şoarece, pe cale intraperitoneală. Cobaiul este comparativ mai rezistent decît şoarecele, iar iepurele mai sensibil. Animalele injectate prezintă, în timpul vieţii, tulburări în modul de repartizare al globulelor albe în sînge şi tulburări glicemice. Injectarea complexului este urmată de leucopenie şi hiperglicemie. Mai tîrziu apare leucocitoza şi hipoglicemia. La autopsia animalelor moarte, se constată congestia intensă a viscerelor abdominale şi, mai ales, a intestinului.

Scanned with OKEN Scanner

Diverși autori au cercetat leziunile histologice produse la cobai prin inoculări repetate de complex glucido-lipidic, în doze mici, submortale. Ei constată, la animalele astfel tratate și apoi sacrificate la diverse intervale de timp, leziuni situate, în special, în țesutul limfoid din ganglioni și splină. Aceste leziuni constau din :

1. congestii, hemoragii și infiltrații cu polinucleare (forme acute) ;
2. focare de necroză înconjurate de o coroană de polinucleare (forma subacută) ;
3. atrofii ganglionare sau a timusului și înlocuirea elementelor normale cu fibroblaste, fascii groase de colagen etc.

În celelalte organe se găsesc leziuni puțin importante și inconstante, ca degenerarea grasă a ficatului, reticuloză în pulmon, picnoză nucleară în pancreas. În capsula suprarenală se constată, în afară de congestie (stadiul prim al inflamației), atrofia și clarificarea stratului glomerular, precum și o hipertrofie a straturilor subiacente, în special stratul fasciculat. Aceste leziuni par a fi datorite tulburărilor vasculare și anume spasmului arteriolelor, care nu se produce însă sub influența directă a toxinei, ci prin mediatori chimici organici, în special prin adrenalină. Aceasta produce tulburările de permeabilitate care atrag, după ele, tulburări trofice.

Complexul, izolat din diversele specii sau diversele tulpini ale aceleiași specii, produce aceleași simptome și leziuni la animalele de experiență. Soru și Combiescu afirmă că un complex este cu atît mai toxic cu cît conține mai mult azot și că, în general, complexul provenind din tulpini atenuate este mai sărac în azot ca cel provenind din tulpini virulente.

În culturi de țesuturi complexul nu produce hemoliză sau leucoliză, nu inhibă multiplicarea celulelor și nu modifică coeficientul lor respirator.

Antigenitate. Complexul, injectat la animalele de experiență — iepuri — pe cale intravenoasă, produce anticorpi protectori, aglutinanți și precipitanți, care au un grad oarecare de specificitate. De exemplu, complexul izolat de la o *Salmonella* din grupul C va produce anticorpi care vor aglutina speciile grupului respectiv, dar nu pe cele din alte grupe. Aceste date au făcut pe A. Boivin și L. Mesrobeanu să identifice complexul glucido-lipidic cu antigenul O al bacteriilor Gram negative.

Bacilul tifosului, spre deosebire de celelalte salmonele, posedă, pe lîngă antigenul O, și un antigen de virulență numit, pentru acest motiv, antigenul Vi. S-a ajuns la descoperirea acestui antigen plecînd de la observația că unele tulpini de bacili ai tifosului sînt mai virulente pentru șoareci și au o mai mare valoare vaccinantă decît altele.

Cercetîndu-se, serologic, cele două categorii de tulpini, s-a constatat că ele nu se comportă în același fel față de un ser aglutinant preparat cu antigenul glucido-lipidic, adică față de un ser care conține anticorpul O. Un asemenea ser aglutinează tulpinile puțin virulente, dar nu pe cele virulente. Acestea din urmă însă devin sensibile după încălzire la 55°C și mai bine încă la 100°C. Aceste date arată că bacilul tifosului conține doi antigeni somatici și anume O și Vi și că acesta din urmă se găsește la suprafața germenului și prezența sa împiedică cuplarea dintre antigenul O și anticorpul O și deci aglutinarea. Fiind însă termolabil, antigenul Vi se distruge prin încălzire și bacteriile devin în urma acestei operații aglutinabile printr-un ser O. Trebuie adăugat însă că există tulpini care conțin numai antigenul Vi și că acestea, bineînțeles, nu devin aglutinabile prin anti-

Scanned with OKEN Scanner

corpul O nici după încălzire. Boivin și Mesrobeanu (1938) au cercetat natura chimică a antigenului Vi și au găsit că este tot un complex glucido-lipidic, care diferă însă de complexul O prin conținutul său în acizi grași și zahăr. De asemenea, antigenul Vi, spre deosebire de antigenul O, este precipitat de sărurile de uranil (acetat de uranil), ceea ce permite separarea sa din soluții mixte. Antigenul O este însă de cinci ori mai toxic, decît antigenul Vi, pentru animalele de experiență.

Complexul glucido-lipidic ocupă în celulă o poziție periferică și pare a fi unul din constituentele membranei bacteriene.

Complexul nucleoproteidic. Acest complex a fost identificat în soma unor bacterii Gram negative, cum sînt *Escherichia coli, Pasteurella animalium,* bacilul morvei, diverse specii ale genului *Salmonella* etc.

Izolarea (tehnica Stamatin-Georgescu). Suspensiile bacteriene se tratează întîi cu acid tricloracetic 5%, după meoda Boivin-Mesrobeanu. Depozitul bacterian, rămas după înlăturarea lichidului care conține complexul glucido-lipidic, este antrenat cu apă distilată și suspensia obținută este alcalinizată, cu soluție n/10 de NaOH, pînă la culoarea roz a fenolftaleinei, pH=8,2—8,4. Se produce, atunci cînd alcalinizarea a atins punctul optim, o cvasisolubilizare a corpilor bacterieni. Amestecul este lăsat cîteva ore la rece, apoi centrifugat 1 oră la 4 000—6 000 de ture pe minut. Lichidul supernatant astfel obținut conține o proteină complexă, care precipită în mediul alcoolic la pH=3,5—4,5 și se solubilizează, dînd o soluție opalescentă, la pH=8,2—8,4.

Precipitările în mediu alcoolic acid și solubilizările în apă, în zona alcalină, urmate de dializă, permit purificarea produsului.

Proprietăți fizico-chimice. Fracțiunea nucleoproteidică reprezintă, pentru *Pasteurella animalium,* 20,49% (8,93—52,9) din greutatea uscată a corpilor bacterieni. Ea conține, pentru aceeași specie, 8,84% (6,12—9,75) azot. Produsul, o dată uscat, se solubilizează greu chiar în apă alcalină. Moleculele sînt reținute în mare parte de filtrul Seitz și produsul își reduce patogenitatea printr-o asemenea operație. Nu se inactivează prin încălzire la 100°C și nici sub acțiunea formolului.

Se pare că are proprietăți antigenice.

Proprietăți biologice. Complexul nucleoproteidic este patogen pentru șoarece, iepure, oaie, cîine și cal. Patogenitatea este manifestă cînd produsul este administrat pe cale intravenoasă sau, pentru șoarece, intraperitoneală.

La iepure, inocularea intravenoasă a unei doze convenabile (0,1—1 mg de substanță uscată) este urmată, în scurt timp (20—30 de minute), de tulburări respiratorii, uneori și digestive, precum și de o leucopenie periferică. Moartea poate surveni după cîteva minute pînă la cîteva ore. Ea survine cu atît mai repede, cu cît doza este mai mare. La autopsia animalelor moarte cu simptome de asfixie, scurt timp după administrarea produsului, se găsesc leziuni congestive ale ficatului, splinei, rinichilor și masei intestinale. Pulmonul, în schimb, este, de regulă, mărit în volum și anemic; uneori poate prezenta zone hemoragice superficiale. Histologic, la aceste animale se găsesc pe lîngă leziuni congestive în organele splanhnice, infiltrații masive cu polinucleare în capilarele pereților alveolari și o tumefiere a celulelor alveolare. Lumenul vascular este blocat de polinucleare.

Scanned with OKEN Scanner

La animalele care mor după 16—20 de ore de la administrarea toxinei se găsesc în ficat focare necrotice microscopice asemănătoare celor întîlnite în febra tifoidă umană și holera păsărilor.

Complexitatea structurii toxice a bacteriilor. Bacteriile Gram negative tratate cu acid tricloracetic eliberează un produs toxic — complexul glucido-lipidic. Corpii bacterieni despuiați de această primă toxină eliberează, în mediu alcalin, o nouă fracțiune toxică — complexul nucleoproteidic. Stamatin, Georgescu și colaboratorii au constatat însă că bacteriile, din care s-au extras aceste două fracțiuni toxice, nu și-au pierdut total toxicitatea și că ele, în cazul speciei *Escherichia coli,* sînt încă capabile să omoare șoarecele pe cale intraperitoneală, ele mai păstrează deci complecși toxici. Incercările făcute cu scopul de a-i izola nu au dat însă, pînă în prezent, rezultate pozitive.

Aceste date arată cît de complexă este structura chimică a unei celule bacteriene patogene.

ROLUL SECREȚIILOR ȘI COMPONENTELOR MICROBIENE IN DEZVOLTAREA PROCESULUI MORBID

Secrețiile și componentele microbilor patogeni privite din punct de vedere al însușirilor lor intrinseci pot fi împărțite, așa cum s-a arătat mai sus, în exo- și endotoxine. Privite din punct de vedere al relațiilor lor cu procesul patologic, ele pot fi împărțite în trei grupe și anume:

— secreții și componente toxice;
— secreții și componente agresinice;
— secreții și componente alergizante și revelatorii.

Secreții și componente toxice. Secrețiile și componentele toxice sînt acele substanțe microbiene care exercită singure și în afara prezenței germenului respectiv o acțiune nocivă asupra macroorganismului.

In această grupă intră, în primul rînd, exotoxinele speciilor bacteriene toxice și nevirulente, cum sînt toxinele bacililor tetanosului, botulismului, difteriei. Aceste secreții produc, cînd sînt inoculate la animale receptive, în doze și pe căi convenabile, aceleași simptome ca și cele întîlnite în infecțiile naturale respective. Tot în această grupă intră diversele hemolizine bacteriene, precum și acele secreții care produc tulburări ale marilor funcțiuni organice. Hemolizinele se întîlnesc la numeroase specii cum sînt: stafilococi patogeni, diverse tipuri de streptococi, bacili anaerobi patogeni, vibrionul holerei etc. Secreții care tulbură marile funcțiuni se găsesc, la fel, la o serie de germeni. *Staphylococcus pyogenes* secretă o substanță toxică care, administrată pe cale intravenoasă, omoară iepurele în cîteva minute. La fel, în lichidele de centrifugare ale culturilor de *Clostridium perfringens* și *Cl. oedematis maligni* se găsesc compuși care provoacă, foarte probabil, paralizia centrilor respiratori și care inoculați pe cale intravenoasă omoară șoarecele în cîteva minute. Componenții nucleoproteidici ai bacteriilor Gram negative omoară iepurele într-un timp foarte scurt. Numeroase alte bacterii secretă substanțe care au o acțiune necrotică asupra diverselor țesuturi. *Staphylococcus pyogenes,* de exemplu, secretă un produs care inoculat pe cale intradermică provoacă necroza țesutului respectiv. Secreții necrotice se găsesc și la bacilii tuberculozei, bacilii morvei etc., dar ei încă n-au putut fi izolați de celula bacteriană respectivă și nu se poate preciza, deci, dacă sînt activi în afara prezenței germenilor respectivi.

Scanned with OKEN Scanner

Secreții și componențe agresinice sau agresinele. Agresinele sînt secreții sau componențe microbiene lipsite de toxicitate, dar care înlesnesc persistența și invazia macroorganismului de către microorganismul secretor.

Termenii de agresiune și activitate agresinică au fost creați de B a i l și colaboratorii săi, la Praga, într-o serie de lucrări publicate între anii 1900 și 1905. (O revistă de ansamblu asupra acestei probleme a fost publicată de B a i l, în 1929). Alți cercetători au adus mai tîrziu, contribuții însemnate asupra însușirilor acestor substanțe, asupra răspîndirii lor la diversele specii patogene și asupra mecanismului lor de acțiune.

B a i l a ajuns la noțiunea de agresine cercetînd infecția cărbunoasă și încercînd să explice mecanismul ei. El pleacă, în primul rînd, de la constatarea că bacilii cărbunelui virulenți, inoculați la un animal, produc un edem în care elementele figurate ale apărării organice, adică leucocitele, sînt absente. Această absență trebuie să aibă o cauză și în această cauză rezidă însăși virulența bacilului, căci bacilii cărbunelui nevirulenți produc reacții locale în care se găsesc suficiente leucocite și în care procesul de fagocitoză este foarte accentuat. Mai mult încă, bacilii virulenți inoculați la animale (iepuri) imune produc o reacție inflamatorie locală în care, la fel, leucocitele sînt foarte abundente și fagocitoza însemnată (A. B o q u e t și N. S t a m a t i n, 1939).

Dacă leucocitele nu vin în focarul creat de bacilii virulenți la un animal normal, aceasta se datorește unei cauze și această cauză trebuie să fie prezentă în lichidul edemului. Cercetările experimentale au confirmat acest raționament. Intr-adevăr, B a i l a constatat că lichidele de edem cărbunos au două însușiri fundamentale și anume:

— înlesnesc infecția;
— imunizează animalele.

B a i l, pentru a demonstra prima proprietate a lichidelor de edem și anume a agresinelor pe care le conțin, le-a inoculat la animale în asociație cu doze submortale de cultură cărbunoasă, observînd, în aceste condiții, că animalele martore injectate numai cu cultură rezistau, în timp ce cele injectate cu cultură plus lichid de edem mureau de cărbune. Capacitatea agresinelor de a înlesni infecția era astfel demonstrată. Trebuie adăugat că lichidele de edem erau în prealabil sterilizate prin filtrare sau cu formol, înlăturîndu-se germenii cărbunelui pe care aceste lichide îi conțin.

Activitatea imunizantă a lichidelor de edem cărbunos și cea a organelor cărbunoase a fost confirmată în repetate rînduri, în așa fel încît asupra acestei însușiri a agresinelor nimeni nu mai are nici o îndoială. La noi în țară, P. R i e g l e r a urmărit îndeaproape această problemă și într-o serie de lucrări executate de elevii săi (I. P o p o v i c i, 1929, A. B e l i o v s c h i 1930), sub conducerea sa, s-a demonstrat activitatea imunizantă a agresinelor. Dată fiind înalta lor valoare imunizantă, s-a cercetat, iar H r u s k a, la Praga, a pus cel dintîi în practică prepararea serurilor hiperimune cu ajutorul agresinelor. Autorul a reușit, folosind agresinele, să prepare un ser anticărbunos foarte activ.

Agresinele, așa cum a stabilit B a i l, sînt termolabile. Ele se distrug în 30 de minute la 55°C și își pierd mare parte din însușirile lor chiar printr-o încălzire prelungită la 44°C. Formolul omoară bacteriile din lichidul de

edem, dar nu afectează agresinele. Filtrarea nu reduce simțitor activitatea imunizantă a agresinelor cărbunoase.

B a i l și alți cercetători au constatat că agresinele se produc în vivo, în țesuturile animalelor receptive, dar nu în mediile obișnuite de cultură. Mai tîrziu, s-a arătat (G l a d s t o n e) că în anumite medii care se apropie de cel oferit bacilului de organismul animal, cum este plasma de oaie, de exemplu, agresinele pot lua naștere în cursul multiplicării bacililor virulenți. Anumite condiții de aerație permit chiar o recoltă bogată de agresine.

Agresinele cărbunoase sînt lipsite, în mod practic, de toxicitate și inocularea lor la animale nu produce tulburări manifeste.

Acțiunea agresinică și imunizantă a lichidelor de edem este specifică.

În urma stabilirii faptului că bacilii cărbunelui pun în libertate, in vivo, și, uneori, in vitro, principii care înlesnesc infecția și imunizează, s-au căutat asemenea substanțe și la alte specii bacteriene. B a i l și colaboratorii săi au afirmat că *Pasteurella animalium* și *Vibrio cholerae* ar secreta asemenea principii, dar acțiunea lor agresinică și imunizantă nu este așa de evidentă ca în cazul bacilului cărbunelui și, în general, aceste afirmații nu au fost confirmate. În ceea ce privește activitatea imunizantă a lichidelor de edem produse, in vivo, la găină, de *Pasteurella animalium,* cercetările au arătat că aceste lichide sînt lipsite de proprietăți vaccinante și că inocularea lor nu imunizează și, mai mult încă, sensibilizează animalele față de infecția pasteurelică. Activitatea sensibilizantă se datorește, foarte probabil, produșilor toxici de natură bacteriană, care există în edem și care exercită o acțiune depresivă asupra organismului.

Cercetările făcute asupra diverșilor componenți sau secreții bacteriene au arătat că la unele specii se pot identifica principii care pot înlesni invazia organismului sau pot imuniza, însă aceste însușiri nu sînt totdeauna asociate între ele, sau, dimpotrivă, sînt asociate cu însușiri nete de toxicitate. Polizaharidele extrase din capsula pneumococilor exercită funcțiuni agresinice nete, dar ei, în general, sînt lipsiți de activitate imunizantă. Activitatea agresinică a polizaharidelor pneumococice a fost demonstrată și verificată de numeroși cercetători. Doze submortale de pneumococi devin, într-adevăr, mortale, cînd sînt asociate cu polizaharidul respectiv.

Activitatea agresinică a polizaharidelor este specifică în sensul că polizaharidul tipului II nu înlesnește decît infecția cu tipul II, dar nu cu tipul III.

Stafilochinaza stafilococilor patogeni are, la fel, funcțiuni agresinice evidente. S-a constatat, în această privință, că o tulpină de stafilococ este cu atît mai virulentă pentru un animal cu cît coagulează mai repede plasma citratată a speciei respective. Tulpinile de tip uman, inactive față de plasma citratată de bou, sînt mult mai puțin patogene pentru această specie decît tulpinile de tip ovin, care sînt active pentru plasma citratată de bou.

Acțiunea agresinelor este în unele cazuri de tip antiopsonic (agresinele pneumococice, stafilococice), iar în alte cazuri ea împiedică probabil diapedeza (endotoxinele bacteriilor Gram negative, agresina cărbunoasă) sau înlesnește difuziunea germenilor în jurul punctului în care ei au pătruns. Înlesnirea difuzării germenilor în țesuturi este realizat de factorul de difuziune prezent la unele specii.

Scanned with OKEN Scanner

Factorii de difuziune sînt substanțe care înlesnesc răspîndirea unor particule în țesuturi și existența lor a fost demostrată de Duran — Reynals (1928—1929). Autorul a izolat din testiculele de taur un principiu care mărește capacitatea de difuziune a unor substanțe colorante în țesuturi. S-a văzut, mai tîrziu, că factorii de difuziune, izolați din testicule, pot influența soarta unor infecții în sensul inhibării sau înlesnirii ei. Astfel, dacă o suspensie de germeni puțin virulenți este injectată împreună cu factorii de difuziune în pielea unui animal receptiv, infecția se poate să nu apară, deși doza administrată reprezintă cel puțin o doză minimă mortală. Faptul se explică prin aceea că sub influența factorilor de difuziune, germenii se răspîndesc în țesuturile din jur în doze inactive, adică în cantități care pot fi distruse de mijloacele locale de apărare ale organismului.

Dacă, dimpotrivă, factorii de difuziune sînt adăugați unei suspensii de germeni foarte virulenți, aceștia se răspîndesc, la fel, pe zone largi, dar ei neputînd fi neutralizați de factori defensivi locali, se multiplică și infecția are un caracter mai grav. S-a constatat, în acest sens, că virusul rabic fix, de regulă inactiv pe cale subcutanată, devine activ cînd este asociat cu factorul de difuziune, care se comportă în acest caz ca o adevărată agresină. In același sens, Kudriavțeva (1953), Trius și colaboratorii (1953) observă că vaccinul B.C.G., asociat cu factorii de difuziune (extract testicular), dă o reacție mai puternică și imunizează mai solid cobaii decît în cazul cînd este inoculat fără acești factori.

Chain și Duthie (1940) identifică factorii de difuziune testiculari cu hialuronidaza, ferment care descompune acidul hialuronic ce se găsește, sub forma unui polimer de consistență vîscoasă, în țesutul conjunctiv. Descompunerea și fluidificarea acestui polimer vîscos prin hialuronidază înlătură barierele tisulare care, în condiții normale, împiedică împrăștierea particulelor inerte sau vii în țesuturi.

Hialuronidaza a fost găsită la unele bacterii patogene cum sînt stafilococii, *Bacillus perfringens, Clostridium oedematiens, Cl. oedematis maligni* și ea, uneori, poate înlesni invazia țesuturilor și ușura apariția infecției sau, dimpotrivă, alteori poate contribui la stingerea procesului morbid. Acest mod diferit de acțiune este în legătură, așa cum s-a spus deja, cu gradul de virulență al germenilor infectanți. Hialuronidaza nu are, în toate cazurile, un rol esențial în infecție. S-a constatat, în această privință, că germenii care au însemnate proprietăți invazive — *Brucella melitensis, Pasteurella pestis* etc. — nu secretă și nu conțin acest ferment. Invazia organismului se poate face deci și în absența acestui factor.

In concluzie, în complexul de mijloace de care dispun microorganismele patogene, există secreții și componenți celulari care fără a fi toxici prin ei înșiși intervin în procesul de infecție prin aceea că înlesnesc persistența și difuziunea germenilor. Unii din acești produși agresinici sînt buni antigeni și de aceea ei au o însemnată valoare imunizantă, alții au o valoare antigenică slabă sau sînt lispiți de antigenitate. Mecanismul acțiunii agresinice este complex și, în general, variază de la un germen la altul, de la o substanță agresinică la alta.

Secreții și componenți alergizanți și revelatori. Secrețiile sau componenții alergizanți și revelatori sînt substanțe microbiene care se comportă într-un fel în organismul infectat cu microbul respectiv și în alt fel în organismul normal. Astfel, extrasul din bacilii tuberculozei, așa numita tuber-

Scanned with OKEN Scanner

culină produce, în doze egale, manifestări diferite la omul normal, în comparație cu cel tuberculos. În timp ce la acesta din urmă o administrare intradermică de tuberculină, diluată în anumite proporții, provoacă o reacție locală și generală, la cel sănătos o asemenea administrare nu este urmată de nici o tulburare. Aceste proprietăți au făcut ca asemenea extrase să fie folosite în scopul de a descoperi, de a revela o infecție ocultă, de unde și numele de produse revelatoare. În afară de aceasta, secrețiile și componenții alergizanți au un rol important în apariția și dezvoltarea unor procese infecțioase.

Studiul substanțelor microbiene din acest grup începe în 1890, cînd R. Koch prepară tuberculina din bacilii tuberculozei. Tuberculina veche sau a lui Koch nu era altceva decît o cultură de bacili ai tuberculozei, în bulion glicerinat 5%, veche de 3—4 luni de zile și al cărei volum era redus la 1/10, prin evaporare pe o baie de apă, încălzită la 100°C. Lichidul obținut avea o culoare brună, era de consistență sirupoasă și conținea 50% glicerină și 50% apă. În lichid se găsesc dispersați corpi bacterieni și substanțe puse în libertate de bacili în cursul dezvoltării lor. Tuberculina brută s-a dovedit a fi mult mai toxică pentru animalele și oamenii infectați decît pentru animalele și oamenii sănătoși. Astfel, 0,1—0,3 ml de tuberculină brută, administrată pe cale intravenoasă, omoară cobaiul tuberculos, dar nu are o acțiune nocivă asupra cobaiului sănătos. Injectată, pe cale intradermică, în doză de 0,01—0,001 ml, ea produce o leziune inflamatoare urmată, eventual, de necroza pielii la cobaiul tuberculos, dar nu provoacă nici o reacție la cobaiul netuberculos.

Date fiind interesantele însușiri pe care le aveau extrasele de bacili ai tuberculozei, s-au cercetat, din acest punct de vedere, și alte specii bacteriene. Primele cercetări, în această privință, au fost făcute asupra bacilului morvei de Helman și Kalning (1891) în Rusia, care au lucrat separat unul de altul, dar au ajuns la același rezultat. Cercetătorii obțin, prin metode similare celor folosite de R. Koch, un produs numit maleină și care ca și tuberculina este mai toxic pentru animalele morvoase decît pentru cele sănătoase și injectat în doze convenabile produce reacții specifice, de tip alergic, la animalele morvoase.

Tuberculina și maleina, o dată descoperite, și-au găsit o folosire universală în diagnosticul respectiv al tuberculozei și morvei. Încercările de a izola produse similare și de aceeași valoare de diagnostic de la alte specii bacteriene nu au dat rezultatele așteptate. Numeroase cercetări s-au făcut în această direcție asupra speciei *Brucella abortus,* ajungîndu-se la unele rezultate pozitive.

Produșii care se găsesc în tuberculină, maleină și hidrolizatele brucelice au proprietăți revelatoare, dar nu alergizante, în sensul că inoculați la un animal sănătos acesta nu devine sensibil, alergic. Totuși, se admite că substanțele care se găsesc, de exemplu, în tuberculină constituie, în corpul bacilar, împreună cu alte substanțe, un complex care, in vivo, are însușiri alergizante, transmite organismului sensibilitatea, starea de alergie.

Aceste date pun în evidență, încă o dată, atît complexitatea reacțiilor organice, cît și a mijloacelor de agresiune microbiană. Substanțele alergizante și revelatoare pe care le posedă unele microorganisme pot interveni, în multe feluri, în procesul patologic ; uneori ele îl inhibă, alteori îi înles-

Scanned with OKEN Scanner

nesc difuziunea și generalizarea. Aplicarea acestor substanțe în practica diagnosticului infecțiilor se bazează pe însușirea lor fundamentală de a sensibiliza organismul.

GAZDA RECEPTIVĂ

FACTORII CARE POT INFLUENȚA RECEPTIVITATEA UNUI ORGANISM

Patogenitatea unei specii bacteriene este relativă, în sensul că ea nu se exercită asupra organismelor tuturor speciilor animale. Unii germeni, de exemplu, afectează un număr important de specii. Astfel, virusul rabic, bacilul cărbunelui și bacilii tuberculozei mamiferelor au proprietăți care-i fac apți să paraziteze, în condiții naturale sau experimentale, organismele celor mai variate mamifere, începînd cu cele de laborator și sfîrșind cu animalele mari domestice sau chiar sălbatice. Alți germeni, dimpotrivă, nu se pot multiplica decît în organismele unui număr restrîns de specii și, uneori, numai în organismul unei singure specii. Gonococul, de exemplu, este un parazit numai pentru om și în condiții naturale și chiar experimentale el nu produce o infecție la animale. La fel, virusul pestei porcine nu este patogen decît pentru porc.

Speciile animale nu sînt deci receptive decît pentru anumiți germeni patogeni. Un germen foarte patogen pentru o specie animală este un saprofit pentru o altă specie și, invers, germenul patogen pentru aceasta din urmă poate fi saprofit pentru cea dintîi. Astfel, o singură pasteurelă virulentă omoară iepurele sau șoarecele, dar aceeași germeni sînt suportați, în doze enorme, de cobai și, dimpotrivă, cîțiva bacili ai tuberculozei umane omoară cobaiul, în timp ce șoarecele rezistă la un număr mare de bacili.

Gradul de receptivitate a diverselor specii animale față de aceeași specie microbiană poate fi și el variat. Bacilul cărbunelui, de exemplu, afectează oaia, calul, boul, cîinele, pisica, iepurele, cobaiul, șoarecele etc. Toate aceste specii sînt considerate receptive, dar cîinele este mai puțin receptiv decît boul, iar boul mai puțin receptiv decît oaia, oaia decît iepurele, iepurele decît șoarecele etc.

Receptivitatea față de un microorganism patogen variază de la o specie animală la alta, dar chiar în cadrul aceleiași specii se întîlnesc asemenea variații, fie de la un grup de animale la altul, fie de la un individ la altul.

Modul de comportare al indivizilor dintr-o specie animală față de un microb patogen dat prezintă, așa cum este bine cunoscut, o însemnată variabilitate. Variațiile se grupează totuși în jurul unei medii care reprezintă receptivitatea naturală a majorității indivizilor care compun specia. Astfel, receptivitatea medie a speciei iepure față de *Bacillus anthracis* (tulpini de virulență plină) se poate exprima prin aceea că infecția se produce cînd se injectează, pe cale intradermică, 100 de bacili. Aceasta înseamnă că din 100 de iepuri inoculați cu această doză vor muri cel puțin 70—80 de animale. În consecință, cei 20—30 de iepuri care au rezistat prezintă o receptivitate mai scăzută ca media speciei. Dar se poate ușor demonstra că printre 100 de iepuri sînt animale cu o receptivitate mai mare ca media speciei. Într-adevăr, inoculînd 100 de iepuri cu 50 de bacili se poate ca in-

fecția să se producă la 10—15 animale, ceea ce înseamnă că există iepuri care au o receptivitate mai mare ca media speciei. Invers, se pot întîlni și iepuri, 1 din 100 sau mai puțin, care rezistă la 1 000 sau 10 000 de bacili, ceea ce înseamnă că există iepuri care au o receptivitate mult mai mică decît media speciei.

Aceste variații de receptivitate în jurul unei valori medii sînt datorite fie unor factori endogeni, adică legați de structura fiecărui organism, cum sînt rasa, vîrsta, constituția organică, starea sistemului nervos, sexul, fie unor factori de mediu, exteriori organismului și deci exogeni, cum sînt alimentația, condițiile de igienă, factorii climatici etc.

Factorii care modifică receptivitatea medie a unui organism, în sensul sensibilizării sale față de infecție, sînt cunoscuți și sub numele de factori predispozanți. Un organism, datorită acțiunii unor asemenea factori, poate deveni un teren favorabil însămînțării sale cu un germen și de aici termenul de „teren" care este folosit pentru a desemna starea de receptivitate mărită a unui organism uman sau animal față de o infecție.

Factorii predispozanți enumerați mai sînt numiți și nespecifici, pentru motivul că acțiunea lor nu favorizează o anumită infecție, ci toate infecțiile. Ei se deosebesc deci de factorii de imunitate care sînt specifici.

Cunoașterea factorilor nespecifici prezintă o deosebită importanță practică pentru că ea ne dă indicații asupra condițiilor în care receptivitatea față de infecții scade sau crește. Interesul economic cere ca această receptivitate să fie cît mai scăzută și de aici interesul studiului acelor factori de mediu care produc această scădere, care măresc deci rezistența organică. Interesul economic cere ca toți indivizii speciilor domestice să se găsească cel puțin la media receptivității naturale sau chiar să depășească această medie.

FACTORI PREDISPOZANȚI ENDOGENI

Rasa. Un factor important în apariția unor infecții îl constituie rasa. În general, rasele de animale de mare productivitate sînt mai receptive ca rasele primitive. Acest fel de receptivitate este general, în sensul că este valabil față de toate infecțiile. Există însă și stări de receptivitate legate de un anumit organ sau țesut care este supus unui efort particular. Un exemplu, în acest sens, îl constituie glanda mamară a vacilor sau caprelor de mare productivitate. Infecțiile mamare, adică mamitele, sînt frecvente la asemenea animale, dar sînt rare la animalele primitive care produc puțin lapte. La găinile ouătoare, infecțiile pasteurelice, salmonelice etc. au la fel o evoluție mult mai gravă ca la găinile primitive care fac anual un număr redus de ouă.

Ameliorarea raselor de animale atrage după sine o creștere a sensibilității lor față de diverși factori de mediu și deci și față de infecție, dar aceasta nu trebuie să ne împiedice să ameliorăm rasele, ci numai trebuie să atragă atenția zootehniștilor, în sensul ca ameliorarea să se facă cu o cît mai mică pierdere a rezistenței naturale. Din aceeași constatare mai rezultă însă că animalele cu productivitate ridicată necesită condiții zooigienice mult îmbunătățite în raport cu rasa primitivă.

Vîrsta condiționează și ea anumite stări de receptivitate, atît la om cît și la animale. Sînt infecții care evoluează numai la tineret, altele, dimpotrivă, de preferință la adulți. Tifosul exantematic evoluează ca o boală benignă

și chiar inaparentă la copii și ca o infecție foarte gravă la adulți și cu atît mai gravă cu cît omul este mai înaintat în vîrstă. Tuberculoza la om ca și la speciile animale îmbracă totdeauna forme mult mai grave la organismele tinere ca la cele adulte.

Diareea albă evoluează la puii de găină în vîrstă de 1 pînă la 28—35 de zile. Mortalitatea este mare la pui îndată după ecloziune, și scade treptat pentru a dispărea către sfîrșitul celei de a 4-a sau a 5-a săptămîni de existență. Puii care nu au murit pînă la această vîrstă rămîn purtători de germeni, ating vîrsta adultă, fac ouă infectate, dar își păstrează, în majoritatea cazurilor, o stare de perfectă sănătate. Infecțiile paratifice se întîlnesc la purcei, dar rar la porcii adulți. Infecțiile colibacilare apar și evoluează sub forme grave, uneori mortale, la tineret, dar ele sînt necunoscute la animalele adulte. Tineretul, în schimb, nu prezintă unele infecții, care sînt frecvent întîlnite la adulți. Pasteureloza, de exemplu, nu se întîlnește la puii de găină, rață, curcă, deși ea este o boală extrem de periculoasă la adulții speciilor respective. Rujetul apare rar la purceii de lapte, deși este frecvent la porcii adulți.

Apariția și dezvoltarea unei infecții, așa cum arată aceste cîteva exemple, este în funcție și de structura fizico-chimică a gazdei. Cum această structură variază în cursul vieții unui individ și sensibilitatea sa față de diverși germeni va varia. O anumită structură este favorabilă cultivării unor paraziți, altă structură altor paraziți. De aici variația de receptivitate în raport cu vîrsta.

Sexul poate apărea ca un factor determinant în apariția și în forma pe care o îmbracă o infecție. Bruceloza, de exemplu, este inexistentă la masculii castrați, evoluează ca o boală, de regulă, inaparentă la taur, berbec, țap, dar, se manifestă prin simptome clinice — avort și mamite — la femele. Agalaxia contagioasă este o boală generală care afectează atît masculii cît și femelele, dar ea este mult mai gravă la femelele în lactație decît la masculi sau la animale sterpe. Structura organelor sexuale predispune la anumite infecții caracteristice sexului. Vaginitele, metritele, mamitele sînt caracteristice femelelor, orhitele masculilor.

Constituția organică poate influența gradul de rezistență a unui organism. Unii indivizi sînt, de exemplu, mai receptivi decît alții față de bacilul tuberculozei. Se constată, în acest sens, că, trăind în aceleași condiții, unii oameni se infectează și alții nu. Aceste diferențe sînt datorite unor particularități de constituție și rezultă dintr-o anumită conformație anatomică și fiziologică a organismului. Se admite, pentru a explica aceste observații, că unele tulburări metabolice pot crea terenuri propice implîntării bacilului tuberculozei.

Starea sistemului nervos influențează receptivitatea organismelor. În general, după datele experimentale, animalele care prezintă o stare de inhibare a activității cerebrale (animale în hibernare, somn provocat etc.) sînt mai rezistente ca cele cu o activitate cerebrală normală. Astfel, din experiențele făcute de O. Popa și V. Bica-Popii rezultă că, la cățeii în stare de somn, toxina pasteurelică nu produce tulburări clinice manifeste, în doze în care omoară constant, cu simptome și leziuni foarte grave, cățeii martori. Mazur și Berlin (1953) observă, de asemenea, că anestezia cu veronal, prelungită timp de 48 de ore, împiedică infecția cu *Salmonella paratyphi B.*

Scanned with OKEN Scanner

Inhibarea corticalității nu are același efect în toate infecțiile. Koleakov (1952) observă, în această privință, că infecția pneumococică și intoxicația tetanică evoluează mai grav la animalele în stare de somn decît la cele treze. De asemenea, s-a mai constatat că anestezia înlesnește transmiterea, pe cale pulmonară, a unor infecții cum sînt infecția tuberculoasă, rabică, rickettsiană etc. Această constatare se explică prin aceea că în stare de somn materialul virulent pătrunde mai ușor în alveole.

O stare de excitabilitate cerebrală, un dezechilibru nervos sensibilizează, la fel, organismele față de unele stări morbide. I. P. Pavlov și Pehova au demonstrat că la cîinii la care s-au provocat nevroze experimentale, printr-o metodă specială de acțiune reciprocă de inhibiție și excitație a scoarței cerebrale, apar modificări distrofice ale pielii, care se traduc printr-o sensibilitate față de flora normală a pielii și apariția unor stări eczematoase.

Diversele intoxicații evoluează mai grav la organismele care prezintă un dezechilibru al activității nervoase superioare. Koleakov (1952) a constatat că la șoarecii infectați cu spirochete, infecția se agravează în urma unei excitații acustice. Șoarecii sînt, de altfel, foarte sensibili și zgomotul soneriei produce, la unii din ei, fenomene de excitație epileptiformă, iar la alții inhibiție totală și moartea imediată.

Transmiterea ereditară a unor stări de rezistență față de anumite infecții este folosită, în lumea vegetală, ca mijloc de luptă împotriva bolilor. Se aleg și se multiplică, de exemplu, varietăți de plante care rezistă la infecțiile caracteristice speciei. Astfel, în țara noastră, se cultivă variante de cartofi care rezistă la boala numită rîia cartofului.

La animalele prolifice s-ar putea, la fel, încerca crearea și răspîndirea raselor rezistente față de unele infecții. Se constată, în această privință, că unii purcei rezistă la infecții severe făcute cu virusul pestei, deși animalele respective nu au fost bolnave sau vaccinate. La fel, unii cîini rezistă la infecții severe făcute cu virusul rabic, iar unii porci la infecții cu virusul pestei. Încrucișarea între animalele rezistente ar putea duce la crearea unor variante rezistente față de bolile respective.

În condiții experimentale, s-a dovedit, de altfel, că progenitura șoarecilor, care au rezistat la o infecție cu *Salmonella typhi murium*, rezistă, procentual, într-o proporție mai mare ca lotul din care ei s-au selecționat. Astfel, din 100 de șoareci luați la întîmplare și infectați cu *Salm. typhi murium* au murit în experiențele pe care le citățm 76%. Șoarecii, rezultați din încrucișarea celor rămași în viață, au dat, la o nouă infecție, o mortalitate de 60%, iar cei rezultați de la supraviețuitorii celor supuși la a doua probă au murit, în urma infecției experimentale, într-o proporție de numai 15%. Prin încrucișări repetate între animale care au rezistat la o infecție se obțin deci variante din ce în ce mai rezistente.

Asemenea selecții s-au făcut și se fac și astăzi în cursul valurilor epizootice. Descendenții organismelor care au rezistat la un prim val epizootic moștenesc capacitatea de a se apăra, în mai bune condiții ca părinții lor, față de agentul epizootiei respective. Se observă, în acest sens, că infecțiile sînt mai puțin mortale în regiunea lor de origine decît în cele în care ea pătrunde pentru prima oară sau după o lungă absență. Exemplele, în această direcție, abundă. Este sigur că pesta bovină, care a fost răspîndită în centrul Europei pînă în secolul al XIX-lea, dar care apoi a dis-

Scanned with OKEN Scanner

părut cu desăvîrşire, ar produce astăzi, în cursul unei eventuale epizootii, mai multe victime decît producea înainte de dispariţia ei şi de cît produce în ţările în care ea este încă prezentă.

De regulă, animalele care sînt în aria geografică a unei infecţii sînt mult mai rezistente decît cele care se găsesc în afara acestei arii. A. Oprescu (1952) aduce, în sprijinul acestei teze, unele observaţii personale făcute asupra babesiozei oilor. El a observat că oile aduse din diverse regiuni ale ţării pe o păşune infectată au dat un procent de mortalitate mult mai mare decît turmele de oi locale. La fel, şi în general bovinele şi ovinele din regiuni indemne de piroplasmoză dau procente mari de morbiditate şi mortalitate cînd sînt transplantate în regiuni mult infectate.

Ereditar se pot transmite însă pe lîngă stări de rezistenţă şi stări de receptivitate. Recent, s-a constatat că mieii născuţi din anumite oi şi avînd anumite caractere exterioare sînt aşa de susceptibili faţă de infecţii, încît germenii banali le produc leziuni oculare, digestive sau pulmonare mortale. Aceste animale sînt desigur lipsite de mijloacele care asigură apărarea organismelor normale faţă de flora bacteriană obişnuită a mediului ambiant. Animalele, prezentînd asemenea susceptibilităţi, se elimină singure sau sînt eliminate prin selecţie. Dacă din punct de vedere economic reţinem pentru exploatare variantele rezistente, pentru acelaşi motiv trebuie să eliminăm pe cele avînd o receptivitate ridicată faţă de infecţii.

FACTORI PREDISPOZANŢI EXOGENI

Factorii exogeni sau de mediu influenţează receptivitatea organismelor animale faţă de diverşi germeni. Cunoaşterea acestor factori este importantă deoarece, spre deosebire de factorii endogeni, ei pot fi mai cu uşurinţă modificaţi în sensul creşterii rezistenţei organice, măririi capacităţii defensive a organismului. Factorii de mediu sînt numeroşi şi variaţi şi noi vom aminti pe unii din cei mai importanţi.

Alimentaţia este un factor de bază în ameliorarea animalelor ca şi în menţinerea sănătăţii lor. O alimentaţie care se abate, într-un sens sau altul, de la regulile stabilite de ştiinţă poate crea stări de receptivitate crescute. O alimentaţie deficitară sau o alimentaţie excesivă, deci şi într-un caz şi în altul neraţională, poate fi cauza unei sensibilizări a organismelor supuse unui asemenea regim. Exemple în această privinţă nu lipsesc.

Astfel, avortul paratific la iepe este, după Poddubski şi Alikajev (1940), o infecţie care se dezvoltă la fetuşii ale căror mame prezintă un dezechilibru fosfo-calcic ca o consecinţă a unei alimentări necorespunzătoare cheltuielilor de energie cerute animalului.

La fel, s-a constatat, de către Poddubski (1951), că anemia infecţioasă a calului îmbracă forme mult mai grave la animalele care se găsesc pe soluri acide (pH = 4,0—5,0) şi sărace în calciu (0,035—0,2%), decît la cele care stau pe soluri cu pH = 6,4—7,0 şi cu conţinut mai mare în calciu (0,3—0,8%). Solul acid şi sărac în calciu intervine, în procesul morbid, tot prin tulburările metabolice rezultate dintr-o alimentaţie pe un asemenea sol.

Avortul paratific se dezvoltă, după unele observaţii, la oile cu hipofosforoză; astfel raportul fosfo-calcic în serul sanguin a fost de 0,18—0,25 în

turmele în care au apărut avorturi paratifice și de 0,31—0,37 în turmele în care nu au apărut avorturi.

Păsările ouătoare devin pradă celor mai variate infecții dacă ele nu primesc o hrană care să corespundă efortului cerut, în special, de sinteza albuminelor care constituie oul. De asemenea, la vacile bune producătoare de lapte se poate produce, în cazul unei alimentații defectuoase, un dezechilibru fosfo-calcic, care, la fel, accentuează receptivitatea organică. Cernăianu, sprijinindu-se pe date din literatură și observații proprii, arată că pasteureloza la păsări este, de multe ori, o complicație a stărilor avitaminotice. Vitamina A exercită funcțiuni defensive pentru mucoase și lipsa ei produce degenerarea și permeabilizarea acestui înveliș. Pasteurelele, care se găsesc ca oaspeți obișnuiți ai căilor respiratorii, pot traversa, în aceste condiții, mucoasa pentru a ajunge în organism și a produce infecția.

Lipsa vitaminei C produce o reducere a capacității oxidante a organismului și o mărire consecutivă a receptivității față de infecții. Dimpotrivă, așa cum reiese dintr-o largă aplicație practică, în special în medicina umană, prezența vitaminei C mărește capacitatea oxidantă și antiinfecțioasă a unui organism. G. Eustațiu și colaboratorii (1944) constată, în acest sens, variații importante în conținutul organelor de cobai în vitamina C (acid ascorbic), în cursul diverselor sezoane. Conținutul cel mai redus este în lunile martie-aprilie, cel mai ridicat, mai-iulie. Or, în laboratoarele experimentale se știe că perioada martie-aprilie corespunde în țara noastră celei mai ridicate sensibilități, iar mai-septembrie celei mai ridicate rezistențe a cobailor față de diverse infecții naturale sau experimentale. Este știut, în crescătoriile de cobai, că perioada cea mai grea o constituie lunile martie-aprilie.

In absența vitaminei D se produce o scădere a puterii bactericide a sîngelui. Această vitamină reglează metabolismul calciului care influențează tonicitatea sistemului simpatic.

Schimbarea bruscă a regimului alimentar constituie de asemenea un factor predispozant. Purceii devin, îndată după înțărcare, sensibili față de infecțiile bacteriene tocmai din cauza schimbării felului lor de alimentație, a absenței din rația lor alimentară a laptelui matern bogat în vitamine și principii nutritivi (albumine, substanțe hidrocarbonate, săruri minerale). Înțărcarea, la toate animalele, este urmată de un dezechilibru organic favorabil instalării infecțiilor prin germeni, în general, nepatogeni față de animale cu o fiziologie normală. De altfel, asemenea infecții se observă nu numai la mamifere ci și la păsări. Puii, îndată după ecloziune, pot prezenta infecții colibacilare, stafilococice, paratifice care apar, în special, la puii hrăniți nerațional. Asemenea infecții nu se întîlnesc, de regulă, la păsările adulte.

O alîmentație excesivă poate predispune organismul față de infecții sau le poate agrava pe cele care evoluează, de regulă, sub forme benigne. Astfel, Manninger și Kotlan afirmă că enzootii grave de rujet pot apărea printre porcii puși la îngrășat, iar degenerarea miocardului, ca o consecință a infecției cu virusul aftos, se produce, mai cu seamă, la animalele prea grase. Mieii abundent hrăniți prezintă o dezvoltare însemnată a tubului digestiv, ceea ce pare că-i sensibilizează față de diversele infecții intestinale — colibaciloze, anaerobioze etc.

Clima și variațiile climatice pot înlesni apariția unor infecții.

Scanned with OKEN Scanner

Frigul favorizează apariţia infecţiilor ai căror agenţi cauzali au drept habitat obişnuit căile respiratorii superioare sau cavitatea bucală. Infecţiile streptococice şi pneumococice la om, cele pasteurelice la păsări apar, de multe ori, ca o consecinţă directă a unei răceli. Holera la păsări apare, uneori, către sfîrşitul lunii august. Alimentaţia, în acest sezon, neputînd fi de regulă încriminată, frigul apare ca singurul agent ajutător al infecţiei. Este foarte probabil că, printre alte influenţe, răceala permeabilizează mucoasa căilor respiratorii, înlesnind infiltrarea pasteurelelor, de pe aceste căi, în organism.

Frigul se poate asocia cu deficienţele alimentare şi ambii factori fac ca receptivitatea animalelor de experienţă faţă de infecţii să fie mult mai mare iarna decît vara. Astfel, pentru aceeaşi tulpină de bacili ai rujetului, doza minimă infectantă este mult mai mare iarna decît vara. La fel se comportă şi cobaii faţă de tulpinile atenuate de cărbune. Doze de germeni, care sînt perfect suportate vara, sînt mortale iarna. Rezistenţa şoarecilor faţă de *Salmonella typhi murium* variază în raport cu sezonul. Iarna, infecţiile bucale sînt constant mortale, în timp ce vara, în aceleaşi condiţii, un procent ridicat de animale rezistă infecţiei. Titrarea serurilor imune pe animale de experienţă trebuie să se facă ţinînd seama de receptivitatea animalelor în raport cu sezonul. Se constată, de exemplu, în mod curent, că dozele de ser antirujetic care protejează vara porumbelul faţă de o cantitate anumită de cultură nu-l mai protejează, în aceleaşi condiţii, iarna. Din punct de vedere practic această observaţie ne arată că doza terapeutică a unui ser variază în raport cu gradul de receptivitate al animalului supus tratamentului : cu cît această receptivitate este mai mare, cu atît doza de ser va fi mai importantă.

Reiese din aceste date că rezistenţa animalelor scade iarna şi creşte vara. Aceste diferenţe sînt în legătură cu numeroşi factori, din care citãm, ca mai importanţi, alimentaţia, temperatura, umiditatea etc. Lumina apare, în acest proces, ca un element de prim ordin. In timpul verii, sub influenţa luminii, ergosterina organică se transformă în vitamina D, producîndu-se o hipertonie simpatică. Toate aceste procese contribuie la mărirea rezistenţei organice. In absenţa luminii, ele nu au loc şi rezistenţa organică se reduce.

Animalele, transportate în regiuni cu un climat diferit de acela în care ele s-au născut şi s-a format rasa cărora aparţin, suferă tulburări organice care se manifestă, printre altele, printr-o ridicare a gradului de receptivitate faţă de infecţii. Această ridicare este cu atît mai însemnată cu cît diferenţele între climatul nou şi cel de origine sînt mai mari. Astfel, vitele din regiuni umede nu se adaptează decît cu mare greutate la climatul regiunilor uscate de stepă. Caii care prezintă forme latente, inaparente, de anemie, fac forme acute grave, dacă sînt transportaţi în alte regiuni cu un alt climat. In perioada de aclimatizare rezistenţa organică se reduce, ceea ce permite virusului să se multiplice şi să dezvolte forme acute de boală.

Igiena. Umiditatea este un important factor ajutător, înlesnind difuziunea infecţiilor. In grajdurile prea umede, transmiterea tuberculozei este favorizată prin aceea că germenii, eliminaţi din căile respiratorii de către animalele bolnave, rămîn mult timp în aer, ceea ce măreşte probabilitatea ca ei să fie inspiraţi, o dată cu aerul, de alte animale. Umiditatea pe de altă parte reduce rezistenţa defensivă a animalelor. Pasteureloza la porci apare, de regulă, în grajdurile umede, reci, la animalele iraţional hrănite.

Scanned with OKEN Scanner

Pasteureloza la bovine este mai frecventă în verile umede decît în cele uscate și boala apare, de regulă, la păşune, după ploaie. Boala dispare prin încetarea păşunatului și ținerea animalelor la grajd. Transportul pe calea ferată sau pe vapor predispune animalele față de diverse infecții bacteriene. Pasteureloza la bovine, ca și la porci de altfel, apare deseori în timpul sau după efectuarea unui transport. În unele țări, pasteureloza bovinelor este cunoscută, din această cauză, sub numele de boală de transport. Factorii favorizanți care intervin, în acest caz, sînt multipli și ei se asociază. Alimentația, lipsa de apă, umiditatea, epuizarea organică etc. pot fi citați ca cei mai importanți. Aglomerarea animalelor în spații restrînse înlesnește desigur difuzarea infecțiilor. Acest factor intervine în timpul transportului, dar îl putem întîlni și în grajduri. Viteza de difuziune a tuberculozei, într-un grup de animale, este mai mare la grajd ca la păşune și în grajd este cu atît mai mare cu cît animalele sînt mai aglomerate. Vitele de stepă sînt infectate într-un procent redus atît timp cît ele stau la păşune; în grajduri însă se infectează cu bacilul tuberculozei tot așa de ușor ca și animalele de rase perfecționate. Grajdurile neigienice pot predispune animalele pe care le adăpostesc la infecții. Lipsa de lumină, de aer, umiditatea și frigul sînt factorii predispozanți pe care îi găsim în asemenea grajduri.

Animalele epuizate printr-o muncă excesivă sînt mai susceptibile față de infecții. Morva la caii slăbiți evoluează, de regulă, mai rapid ca la animalele în stare normală. Tuberculoza este agravată de stările fiziologice consecutive unor munci epuizante.

Diferite stări morbide pot, la fel, favoriza apariția unor infecții și agrava evoluția lor. Diabeticii, de exemplu, se infectează ușor cu stafilococi și aceste infecții au o evoluție mult mai gravă la persoanele cu tulburări glicemice decît la cele sănătoase. Unele infecții microbiene se complică frecvent cu alte infecții. Pesta porcină este o infecție primară, care se instalează și evoluează independent de alți factori. Un organism însă a cărui integritate anatomică și funcțională a fost zdruncinată prin acțiunea virusului pestei este invadat de unii germeni, accidental patogeni, cum sînt *Salmonella suipestifer, Pasteurella animalium* etc. La fel, cîinii, debilitați prin acțiunea virusului jigodiei cad pradă infecțiilor cu cei mai variați germeni cum sînt streptococi, pasteurele etc. care, în condiții naturale, nu-i afectează. Leziunile din febră aftoasă, variolă, tuberculoză etc. se pot complica prin invazia unor bacterii. Invazia secundară poate avea, uneori, consecințe mult mai grave ca cea primară. Rujetul, mortal într-o mare proporție la porci, se grefează, după unii autori, pe organisme debilitate prin acțiunea unui virus, care, în absența bacililor rujetului, produce tulburări abia aparente.

Aceste cîteva exemple ilustrează rolul pe care îl joacă organismul în apariția și dezvoltarea infecțiilor. Ne putem întreba ce raporturi există între patogenitatea microbiană și receptivitatea gazdei sau, cu alte cuvinte, prin ce contribuie unul și prin ce celălalt factor în izbucnirea și evoluția infecției? Importanța unuia sau altuia din cei doi factori variază de la o infecție la alta. În general, germenii de înaltă patogenitate se grefează, se

multiplică şi produc infecţii pe orice organism receptiv aparţinînd unei specii sensibile, cu condiţia ca germenul să parvină pe o cale potrivită şi în doză suficientă în intimitatea ţesuturilor organismului respectiv. Virusurile pestei porcine, turbării, febrei aftoase, bacilii cărbunelui, tetanosului produc infecţii oricare ar fi rezistenţa nespecifică a organismelor în care au pătruns, adică oricare ar fi starea lor de întreţinere, igienă, oricare ar fi sexul, vîrsta, constituţia lor organică.

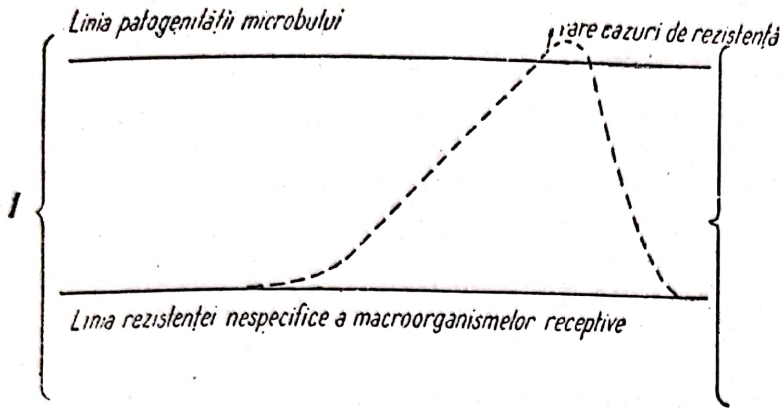
În aceste cazuri, organismul nu poate opri apariţia infecţiei, dar el totuşi intervine în proces şi îi influenţează evoluţia. Popa şi Bica-Popii au arătat, de exemplu, că infecţia cărbunoasă experimentală la cobai evoluează mai repede iarna decît vara şi că în sîngele animalelor moarte se găsesc, pe unitatea de volum, mult mai mulţi germeni vara decît iarna.

Rezistenţa nespecifică datorită, aşa cum s-a spus mai sus, unor factori endogeni sau exogeni are însă un rol esenţial în producerea infecţiilor ai căror agenţi sînt facultativ patogeni, adică au o patogenitate condiţionată de o receptivitate particulară a gazdei. Predispoziţiile organice constituie, pentru aceşti germeni, factorul cel mai de seamă în desfăşurarea proprietăţilor lor patogene. Ei sînt, de regulă, prezenţi pe mucoasele aparente sau în conţinutul aparatului digestiv şi nu pot invada un organism al cărui sistem defensiv este integru, dar se infiltrează de îndată ce acesta şi-a pierdut integritatea anatomică sau funcţională. Germenii din această grupă sînt cantonaţi la porţile organismului şi de îndată ce se iveşte o ocazie favorabilă ei se transformă din inofensivi în agresivi. Rolul factorilor predispozanţi în producerea infecţiilor, nu trebuie însă exagerat. Diminuarea facultăţilor defensive, sub influenţa acestor factori, nu poate predispune un organism faţă de orice germen. Astfel, oricît de diminuată ar fi rezistenţa unui cal, el nu poate fi infectat cu virusul pestei porcine sau cu al variolei ovine. Zdruncinarea rezistenţei organice poate însă permite instalarea în condiţii experimentale a unor infecţii care altfel nu reuşesc. Astfel, găina ţinută la frig, aşa cum a arătat Pasteur, poate fi infectată cu bacili ai cărbunelui virulenţi; broasca ţestoasă, ţinută la 37°C, se infectează şi ea cu bacilii cărbunelui (Cornelson şi col. 1951) etc.

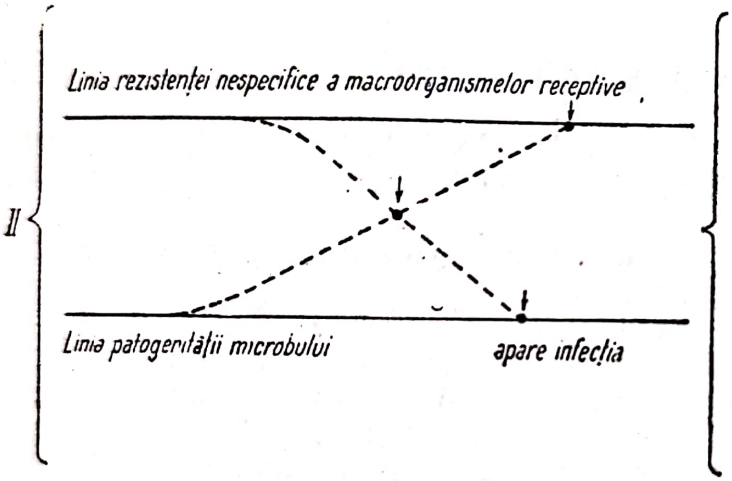
Dacă am reprezenta (vezi schema de la pag. 270) patogenitatea germenilor şi rezistenţa gazdei prin două linii paralele, s-ar putea constata că, în unele infecţii, nivelul patogenităţii este aproape totdeauna superior rezistenţei organice nespecifice. Astfel, nivelul patogenităţii virusului pestei porcine, virusului febrei aftoase, virusului pestei aviare etc. acoperă totdeauna nivelul rezistenţei nespecifice a speciilor receptive. Din această cauză, în infecţiile produse de asemenea microbi, procentul de morbiditate este, de regulă, de 100%. Dimpotrivă, în alte cazuri, nivelul rezistenţei nespecifice a speciilor animale receptive este, de regulă, superior nivelului patogenităţii germenului. Asemenea raporturi se întîlnesc, de exemplu, între rezistenţa organismelor animale — oaie, bou, cal — şi vaccinurile anticărbunoase, între organismele diverselor specii animale şi colibacili, salmonele, unele pasteurele etc. În cazul unor asemenea raporturi, liniile rezistenţei şi patogenităţii merg, de cele mai multe ori, paralel şi, în conse-

Scanned with OKEN Scanner

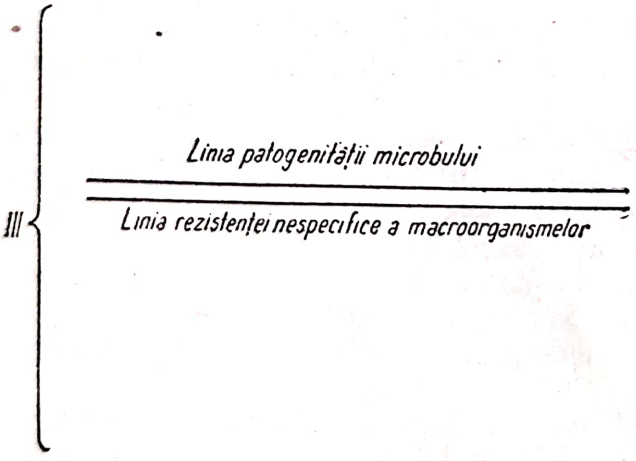
SCHEMA RAPORTURILOR POSIBILE DINTRE MICROORGANISMELE PATOGENE ȘI MACROORGANISMELE RECEPTIVE



Patogenitatea microbului domină rezistența nespeciiică a macroorganismelor și, în consecință, infecția, cu rare excepții, apare ori de cîte ori microbul vine în contact cu macroorganismele speciilor receptive. Exemplu : febra aftoasă



Rezistența nespecifică a macroorganismelor domină patogenitatea germenilor și, în consecință, infecția nu apare decît rareori și anume : fie atunci cînd rezistența nespecifică a macroorganismelor se reduce sub media speciei, fie cînd patogenitatea microbului crește peste media speciei respective.
Exemple : colibaciloza ; uneori pasteurelozele animale.



Linia patogenității microbului se confundă cu linia rezistenței nespecifice a macroorganismului, creîndu-se, de regulă, stări de echilibru între cei doi antagoniști (infecții latente).
Infecția devine clinică cînd se modifică raporturile dintre micro- și macroorganism în favoarea celui dintîi.
Exemplu : tuberculoza.

cință, nu se întîlnesc. Uneori însă apar infecții, ceea ce arată că cele două linii nu au mai mers paralel, că ele s-au întîlnit. Această întîlnire se poate datori :

1. Coborîrii liniei rezistenței la nivelul liniei patogenității. Viței rău întreținuți, de exemplu, fac colibaciloze din cauză că nivelul rezistenței lor se reduce la nivelul patogenității colibacililor existenți în tubul digestiv.

Scanned with OKEN Scanner

2. Ridicării liniei patogenităţii germenului la nivelul liniei care reprezintă rezistenţa organică nespecifică şi caracteristică speciei considerate. In condiţii naturale, pasteurela aviară, de exemplu, îşi poate exalta patogenitatea în aşa măsură, încît produce o boală cu caracter contagios la păsări, avînd o rezistenţă normală.

3. Liniile patogenităţii şi rezistenţei se apropie una de alta, adică germenul îşi exaltează virulenţa într-o oarecare măsură, iar rezistenţa organismului se coboară la nivelul patogenităţii exaltate. Cele două linii se întîlnesc şi infecţia apare. O exemplificare a acestei situaţii o găsim în cazurile de holeră aviară care apar sporadic în unele crescătorii şi care sînt produse de germenii de virulenţă scăzută.

In fine, sînt cazuri în care linia patogenităţii se confundă cu linia rezistenţei. In asemenea condiţii se creează, de regulă, infecţii latente, care pot deveni clinice cînd rezistenţa organică se reduce sub nivelul patogenităţii germenilor. In acest fel se comportă, de exemplu, bruceloza la bovine, unele forme de tuberculoză la om şi diverse specii animale etc.

POARTA DE INTRARE

ROLUL ŞI IMPORTANŢA PORŢII DE INTRARE IN DEZVOLTAREA DIVERSELOR INFECŢII

Se înţelege prin poarta de intrare locul (ţesutul, regiunea) prin care un microb patogen pătrunde în organism.

Agenţii infecţiilor sînt exteriori organismului receptiv şi pentru a-l îmbolnăvi, ei sau produsele lor, trebuie să pătrundă în intimitatea ţesuturilor, să-şi facă un drum în aceste ţesuturi. Această pătrundere este lesnicioasă pentru unii germeni, dar este dificilă pentru alţii. Microbii patogeni pot fi împărţiţi, din punct de vedere al modului de pătrundere în organism, în două grupe:

1. microbi care traversează, chiar dacă este intact, învelişul care separă organismul de mediul ambiant; aceşti germeni nu au deci nevoie de o poartă artificială de intrare;

2. microbi care nu traversează învelişul exterior intact şi nu pot pătrunde în organism decît printr-o poartă artificială, deci atunci cînd tegumentele şi-au pierdut integritatea anatomică sau funcţională.

Germenii din prima grupă nu au nevoie de o poartă artificială de intrare în organism, cei din urmă nu pot pătrunde decît printr-o poartă accidental creată. Pentru unii poarta de intrare este fără importanţă în producerea infecţiei, pentru alţii ea este esenţială. Să ilustrăm aceste afirmaţii prin cîteva exemple.

Numeroase specii de microbi traversează pielea şi mai ales mucoasele intacte. Stafilococii, de exemplu, se infiltrează prin canaliculele glandelor sudoripare şi ajung, astfel, în contact cu umorile organismelor în care ei se multiplică. *Brucella abortus, Pasteurella tularensis* pot, după unii cercetători, traversa pielea intactă. Bacilul tuberculozei, în condiţii naturale, traversează mucoasele tubului digestiv sau ale aparatului respirator, ajungînd, astfel, la intimitatea ţesuturilor. Depus pe mucoasa conjunctivală a cobaiului, el produce infecţia. El este, la fel, infectant atunci cînd este administrat pe cale bucală sau inhalat o dată cu aerul. Febra tifoidă este o

Scanned with OKEN Scanner

infecție de natură hidrică și se produce în urma pătrunderii germenilor întîi în tubul digestiv și apoi în țesuturi. Bacilul morvei, virusul pestei porcine, virusul pestei aviare etc. produc infecțiile respective traversînd, de regulă, mucoasa tubului digestiv.

Patogenitatea germenilor din a doua categorie este condiționată de existența unei porți accidentale de pătrundere. Virusul rabic este inactiv pe cale digestivă și depus pe pielea intactă el nu produce infecția. Aceasta nu apare decît atunci cînd pielea sau mucoasa organismului sensibil prezintă o soluție din continuitate. Bacilul cărbunelui nu traversează, la fel, pielea și se pare că nici mucoasele intacte. Depus pe pielea sau pe mucoasa conjuctivală a cobaiului, el nu produce infecția. Administrat pe cale bucală nu este infectant decît numai dacă este înglobat în alimente capabile să erozioneze mucoasa bucală, să creeze aici o poartă artificială de intrare. Mucoasa aparatului respirator pare a fi însă permeabilă pentru bacili. Într-adevăr, insuflîndu-se la iepure, pe cale nazală, o cantitate mare de spori, se poate reproduce infecția cărbunoasă.

Virusul turbării, bacilul cărbunelui, ca și alți germeni pătrund în organism printr-o leziune de mică importanță a învelișului extern. Soluția de continuitate este importantă prin aceea că le deschide intrarea în organism, natura ei neprezentînd importanță în evoluția infecției. Alți germeni, pentru a dezvolta un proces morbid, au nevoie nu de o poartă de intrare oarecare, ci de o poartă care să aibă anumite proprietăți.

Sporii bacililor tetanosului, sporii bacililor care produc gangrena gazoasă ajung, adeseori, dată fiind marea lor răspîndire în natură, pe diversele eroziuni ale învelișului diverselor organisme sensibile. Infecția, cu acești germeni, nu este însă așa de frecventă, pentru că o simplă eroziune nu le oferă condiții favorabile multiplicării, căci pentru a se multiplica ei trebuie să găsească, la locul de pătrundere, un mediu lipsit de oxigen, bogat în lichide și țesuturi mortificate. Infecțiile respective, din această cauză, sînt complicații ale unor plăgi profunde, anfractuoase, neglijate din punct de vedere medical. În aceste cazuri deci poarta de intrare și calitățile ei decid de apariția infecției.

Pierderea integrității anatomice a învelișului extern poate ocaziona o infecție. Modificările fiziologice ale acestor învelișuri pot avea consecințe asemănătoare. Frigul, deficiențele alimentare, diverse infecții primare, așa cum am văzut mai sus, pot permeabiliza mucoasele, creîndu-se astfel porți de intrare pentru germenii care se găsesc, în mod constant, pe mucoase.

Poarta de intrare este un factor esențial în apariția unor infecții. Absența unei porți naturale explică rezistența de care se bucură unele specii animale față de unii germeni. Astfel, cobaiul este, în condiții experimentale, animalul cel mai sensibil față de bacilii tuberculozei de tip uman sau bovin, dar în condiții naturale el nu se infectează decît excepțional de rar, chiar cînd cohabitează cu animale tuberculoase. Bacilul cărbunelui este foarte patogen, tot în condiții experimentale, pentru șoarece, cobai, iepure, dar aceste animale nu se infectează în condiții naturale. Aceste diferențe între modul de comportare a unei specii animale față de infecțiile experimentale și naturale nu pot fi explicate decît prin aceea că germenii respectivi nu găsesc, în condiții naturale, o poartă de pătrundere în organism. Introduși experimental, în intimitatea țesuturilor, ei se pot înmulți și produce infecție, deoarece țesuturile nu se pot opune multiplicării lor. Imper-

Scanned with OKEN Scanner

meabilitatea învelişului lor exterior le asigură, cu toată această deficienţă a sistemului defensiv interior, o rezistenţă aproape totală faţă de germenii infecţiilor citate.

Germenii patogeni nu găsesc în diversele ţesuturi care constituie un animal receptiv condiţii egale de multiplicare, deci de producere a infecţiei. Virusul rabic, de exemplu, produce regulat turbarea la cîine, iepure, oaie etc. cînd este introdus în ţesutul nervos central, dar nu o mai produce, cu aceeaşi regularitate, cînd este introdus în piele, sub piele, în cavitatea peritoneală sau în torentul circulator. Ţesutul cerebral este faţă de numeroşi germeni cel mai receptiv. Virusuri nepatogene pe alte căi sînt infectante cînd sînt administrate pe cale intracerebrală. Virusul pestei aviare clasice omoară şoarecele, cobaiul, cîinele etc. cînd este injectat intracerebral, dar nu produce nimic pe alte căi. Animalele refractare faţă de *Bacillus anthracis* pot face infecţia cînd administrarea se face direct în ţesutul cerebral.

Celelalte ţesuturi se comportă diferit faţă de diverşii germeni patogeni. Astfel, faţă de *B. anthracis* pielea este mai receptivă decît cavitatea peritoneală, dar faţă de *Pasteurella animalium* cavitatea peritoneală este mai propice producerii infecţiei decît pielea.

Cavitatea pleurală este, în general, foarte receptivă şi ea cultivă cei mai variaţi germeni.

DOZA DE GERMENI

DOZA MINIMĂ LETALĂ

Se înţelege prin doză minimă letală — prescurtat d.l.m. — cantitatea minimă de germeni sau toxină capabilă să producă o infecţie sau intoxicaţie mortală la un animal de o anumită vîrstă şi greutate dintr-o specie dată.

Microbii produc, în cazul administrării lor parenteral şi în cantităţi mari, tulburări, chiar dacă ei aparţin unor specii saprofite, deoarece proteinele, ca şi alţi componenţi ai celulei bacteriene, exercită o acţiune nocivă asupra organismului. Microbii patogeni spre deosebire de cei saprofiţi sînt însă nocivi în doze mici. Astfel, o singură pasteurelă virulentă omoară şoarecele, cîţiva bacili ai tuberculozei infectează cobaiul, a milioana parte dintr-un mililitru de toxină tetanică intoxică mortal şoarecele etc. Pentru a compara capacitatea infectantă a diverselor specii microbiene, precum şi gradul de receptivitate a diverselor specii animale faţă de aceeaşi specie microbiană, este necesar să se precizeze doza minimă mortală sau letală.

D.l.m. variază în raport cu specia microbiană, cu specia animală şi poarta de intrare. In cazul aceleiaşi specii microbiene ea variază, în limite largi, de la o tulpină la alta, iar, pentru aceeaşi specie animală ea variază de la individ la individ şi de la o cale de pătrundere la alta. Doza minimă mortală pentru o tulpină microbiană se dă totdeauna, din această cauză, în raport cu specia animală şi poarta de intrare. Astfel se spune : *Bacillus anthracis* tulpina 95 omoară iepurele, pe cale intradermică, în doza de...

Variaţii privind receptivitatea aceleiaşi specii animale faţă de diversele specii microbiene sînt frecvente. Cobaiul, de exemplu, este receptiv faţă de bacilii tuberculozei, morvei, antraxului, cărbunelui enfizematos, faţă de virusurile rabic etc., dar dozele limite mortale variază de la o specie mi-

Scanned with OKEN Scanner

crobiană la alta. La fel de frecvente sînt și variațiile în raport cu specia animală. Astfel, șoarecele, cobaiul, iepurele, oaia, calul, boul, cîinele etc. sînt sensibile față de *B. anthracis,* dar în timp ce șoarecele este omorît de un singur bacil, pentru a infecta cîinele sînt necesari miliarde de germeni.

Doza minimă mortală variază pentru aceeași tulpină microbiană și pentru același animal și în raport cu calea de inoculare, cu țesutul în care s-a depus microbul. Țesuturile aceluiași organism nu au aceeași receptivitate față de aceeași specie microbiană. Bacilul cărbunelui, de exemplu, omoară cobaiul pe orice cale, dar doza minimă letală pe cale intraperitoneală este de 600 de ori mai mare ca aceea care îl omoară pe cale intradermică (I. Popovici). Cavitatea peritoneală necesită doza cea mai mare de germeni, țesutul cutanat ca și cel nervos, doza cea mai mică. Celelalte țesuturi au o sensibilitate intermediară. Alte bacterii se comportă în alt mod. Colibacilul, de exemplu, este nepatogen pe cale subcutanată, pentru cobai, dar pe cale intraperitoneală este activ și omoară constant acest animal. *Pasteurella animalium* se comportă, în linii generale, la fel. Se constată, în acest sens, că tulpini nepatogene pe cale subcutanată sînt patogene, pentru șoarece, pe cale intraperitoneală.

Tulpinile de virusul pestei aviare omoară șoarecele pe cale intracerebrală, dar ele sînt inofensive pe alte căi.

DETERMINAREA DOZEI MINIME LETALE

Determinarea dozei minime letale se face prin diverse metode.

1. NUMĂRĂTOAREA GERMENILOR VII

Numărătoarea germenilor vii injectați este desigur metoda cea mai bună, dar ea nu este totdeauna comod de aplicat, nu dă totdeauna rezultate precise și nu se poate aplica la toate speciile microbiene. Numărarea germenilor vii se poate face prin culturi pe agar în plăci sau în medii lichide.

Metoda culturilor în plăci. Se fac diluții din 10 în 10 din suspensia de cercetat — cultură în bulion sau suspensii din culturi pe medii solide bine omogenizate.

Diluțiile care conțin, după date probabile, un număr redus de germeni sînt însămînțate în plăci. In acest scop, se pune 1 ml din diluția respectivă într-o placă Petri și se adaugă apoi un strat subțire de agar topit și răcit în jurul temperaturii de 45°C. Placa se răsucește repede pe o suprafață plană pentru a răspîndi germenii, cît mai uniform, în mediu, în așa fel încît, pe cît posibil, dintr-un singur germen să rezulte o singură colonie. Este recomandabil, pentru a evita erorile prea grave, ca fiecare diluție să se însămînțeze pe cel puțin două plăci. Însămînțările se fac din mai multe diluții. Astfel, dacă bănuim că suspensia conține 1 miliard de germeni în 1 ml se fac însămînțări, cel puțin, din diluțiile 1/10 și 1/100 000 000. Perioada de incubație trecută, se numără coloniile care au rezultat din fiecare diluție, se face o medie pentru fiecare diluție și se află în acest fel numărul de germeni conținuți pe unitatea de volum din suspensia dată.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatele obținute, prin această metodă, au o însemnată precizie cînd:

1. suspensia a fost bine omogenizată și nu a conținut germeni grupați în lanțuri sau grămezi.

2. Mediul a fost favorabil și a permis fiecărei celule să se multiplice și să dea o colonie.

Alegerea mediului este problema cea mai grea.

Metoda diluțiilor în medii lichide se aplică germenilor care nu se dezvoltă pe medii solide, în plăci Petri, sau nu dau, pe acest mediu, colonii vizibile și ușor de numărat.

Suspensia se diluează și, în acest caz, ca și mai sus, din 10 în 10, în bulion sau alt mediu lichid. Mediul din tubul sau tuburile în care se bănuiește că numărul germenilor conținuți este mai mic de 10 se împarte în 10 tuburi separate, cîte 1 ml în fiecare tub. Aceste tuburi se incubează 24—48 de ore și apoi se face citirea. Dacă din cele 10 tuburi însămînțate cu cîte 1 ml de mediu, provenite, de exemplu, din diluția de 1/1 000 000 000, se dezvoltă o cultură a germenului respectiv în trei tuburi, suspensia inițială conține 3 miliarde de germeni; la fel ea conține 4 miliarde dacă cultura s-a dezvoltat în patru tuburi și așa mai departe.

Rezultatele obținute prin acest procedeu sînt precise cînd diluțiile au fost corect făcute, fiecare diluție a fost bine omogenizată și mediul folosit favorabil germenului respectiv. Mediul, în special, prezintă cea mai mare importanță.

În mod curent, în laborator, puterea patogenă a diverselor tulpini nu se exprimă totdeauna prin numărul de germeni vii inoculați la un animal, ci prin diluția de germeni dintr-o suspensie dată. De exemplu, tulpina A de *Pasteurella animalium* omoară iepurele cu 1/100 000 ml dintr-o cultură în bulion de 24 de ore, iar tulpina B, din aceeași specie, cu 1/1 000 000 000 ml din aceeași cultură. Diluția se poate raporta, bineînțeles, și la o suspensie provenită de pe un mediu solid, suspensie care are un grad de turbiditate raportat la o scară nefelometrică.

Acest procedeu, în raport cu cel al numărării germenilor vii, nu dă rezultate false și el exprimă raporturile reale de patogenitate între diversele tulpini ale aceleiași specii.

Numeroase cercetări au arătat, într-adevăr, că numărul germenilor vii conținuți pe unitate de volum a unui mediu dat este mereu același, pentru aceeași specie microbiană. Concentrarea germenilor, în același mediu de cultură, fiind o constantă, mai ales la speciile care nu sporulează, metoda diluțiilor este exactă. Cunoscînd constanta unei specii putem preciza, în consecință, numărul germenilor conținuți de o diluție. Tulpinile virulente de *Pasteurella animalium* omoară șoarecele cu diluție de 1/1 000 000 000 dintr-o cultură în bulion de 24 de ore. Cum 1 ml dintr-o asemenea cultură conține 1—3 000 000 000 de germeni vii, înseamnă că chiar un singur germen poate omorî acest animal.

2. CÎNTĂRIREA GERMENILOR

Cîntărirea germenilor poate permite, pentru unele bacterii ca și pentru virusuri, să exprimăm d.l.m. comparativă a diverselor tulpini. Puterea patogenă a diverselor tulpini de bacili ai tuberculozei se exprimă, de exemplu, în miligrame de germeni uscați sau umezi capabili să omoare diversele animale. Unele tulpini bovine omoară iepurele în doze de 10^{-5} mg, altele în doze de 10^{-2} mg etc.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru virusuri se folosește tot metoda cîntăririi, însă aici nu se cîntăresc germenii, ci materialul virulent care îi conține. Astfel, se spune că a mia parte dintr-un gram de creier rabic omoară iepurele sau a suta parte dintr-un gram de splină provenind de la un porc mort de pestă porcină provoacă infecția la un animal sănătos.

3. DL. 50 CA MIJLOC DE APRECIERE A PATOGENITĂȚII MICROBIENE

În ultimul timp s-a introdus, pe o scară largă, pentru aprecierea capacității patogene a unei suspensii virulente sau a unei soluții de toxină, noțiunea de DL. 50, ceea ce reprezintă doza de material virulent care omoară 50% din animalele inoculate. S-a ajuns la această noțiune după ce s-a constatat că DL. 50 este mai puțin influențată de variațiile de rezistență ale animalelor și dă rezultate statistice mai exacte decît atunci cînd se folosește, pentru această apreciere, doza care omoară 100% din animalele inoculate.

Determinarea valorii lui DL. 50 se face după metoda preconizată de Reed și Muench (1938) care se bazează pe următoarele principii:

1. Fiecare grupă considerată (animale inoculate etc.) trebuie să fie formată din cel puțin cinci indivizi.

2. Diluția critică (50%) trebuie să fie încadrată de cel puțin două diluții superioare și două diluții inferioare.

3. Rezultatele sînt adunate prin metoda totalurilor cumulative, care constă din a aduna, pentru fiecare diluție, toți indivizii ce au murit, plecînd de la diluțiile cele mai puțin concentrate și pînă la diluția respectivă și toți indivizii ce au supraviețuit, pornind de la diluțiile cele mai concentrate și pînă la diluția respectivă.

Operînd astfel se obțin rezultatele în genul celor din tabelul 35.

Tabelul 35

Rezultatele inoculărilor la șoareci cu diluții de la 10—1 la 10—7

Diluțiile	Numărul șoarecilor			Totaluri cumulative		
	Inoculați	Morți	Supraviețuitori	Morți	Supraviețuitori	Decese
10—1	6	6	0	27*	0	100
10—2	6	6	0	21**	0	100
10—3	6	5	1	15	1***	93
10—4	6	5	1	10	2	83
10—5	6	4	2	5	4	56
10—6	6	1	5	1	9	10
10—7	6	0	6	0	15	0

* 27 = suma cifrelor totale din coloana a III-a.
** 21 = suma cifrelor din coloana a III-a, de la rîndul doi în jos (fără rîndul 1).
*** 1 = numărul șoarecilor morți pînă la această diluție, adică pînă la 10^{-3}

Este evident că diluția care a dat exact 50% de decese se găsește situată între diluția 10^{-5} (56% decese) și diluția 10^{-6} (10 decese).

DL. 50 s-ar putea determina experimental reîncepînd experiența cu diluții eșalonate între 10^{-5} și 10^{-6}. Pentru a cîștiga timp și a economisi animalele, se procedează la calculul cifrei de 50%, urmînd una sau alta din următoarele metode.

METODE ARITMETICE DE DETERMINARE A DL. 50

Metoda 1. Considerăm diluțiile ce încadrează diluția 50%, pe care dorim să o determinăm. Dacă notăm cu A numărul animalelor ce au murit la concentrația cea mai mare (titrul cel mai scăzut) și cu B al șoarecilor care au supraviețuit la aceeași concentrație (A>B; dacă A=B, diluția reprezintă tocmai DL. 50) și dacă notăm cu C numărul animalelor ce au murit la diluția cea mai puțin concentrată din a doua diluție și cu D cei ce au supraviețuit la această diluție (C>D), fracția de adăugat la expozanta logaritmică (distanța proporțională) a celui mai scăzut titru (diluția ce a servit la inocularea lui A și B), pentru a avea punctul exact al DL. 50, este dată prin formula:

$$\frac{(A-B)\ (C+D)}{2\ (AD-BC)}$$

Diluțiile incadrînd doza DL. 50 și rezultatele lor

$$\frac{A}{C}\ \Big|\ \frac{B}{D}$$

sînt, în exemplul precedent, diluțiile 10^{-5} și 10^{-6}, ce dau

$$\frac{5}{1}\ \Big|\ \frac{4}{9}$$

Dacă se aplică formula, se găsește

$$\frac{(5-4)\ (1+9)}{2\ (45-4)} = \frac{10}{82} = 0{,}12$$

Titrul DL. 50 este deci $10^{-5,12}$.

Metoda 2. Dacă s-a calculat procentul decese[lor], punctul 50% ar putea fi determinat cu o precizie suficientă aplicînd formula următoare:

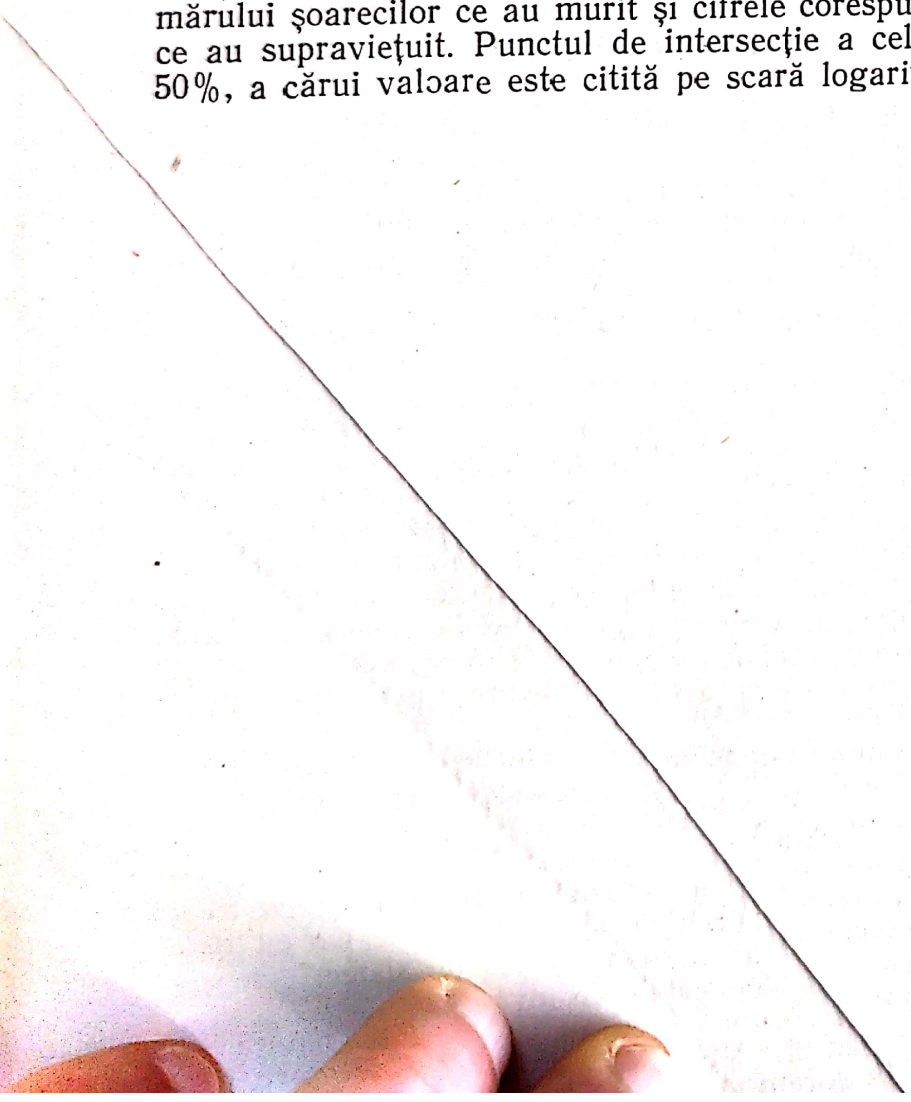
$$\frac{\text{(mortalitatea imediat superioară celei de 50\%)} - 50}{\text{(mortalitatea imediat superioară celei de 50\%)} - \text{(mortalitatea imediat inferioară celei de 50\%)}}$$

În exemplul precedent, pentru care procentele ce încadrează diluția 50% sînt respectiv 56% și 10% formula dă:

$$\frac{56-50}{56-10} = \frac{6}{46} = 0{,}12$$

METODA GRAFICĂ

Se ajunge la același rezultat, fără nici un calcul, servindu-ne de o foaie de hîrtie semilogaritmică cu diviziuni zecimale. Trebuie întîi să se determine procentele cumulative ale șoarecilor ce au supraviețuit și ale șoarecilor ce au murit la proba ce încadrează punctul 50% (cifrele A, B, C, D, din metoda aritmetică). Se așază pe ordonate, scara aritmetică a foii, pentru a înscrie aici numărul șoarecilor și pe abcisă, scara logaritmică, pentru a marca diluțiile virusului. Se pun patru puncte corespunzînd șoarecilor ce au supraviețuit și șoarecilor ce au sucombat la concentrațiile corespunzătoare. Acestea sînt înscrise pe scara logaritmică, extremitatea stîngă a foii corespunzînd celei mai mari concentrații, extremitatea dreaptă a foii corespunzînd celei mai mari diluții din cele două diluții logaritmice incadrînd diluția 50%. Se unesc prin linii drepte cifrele corespunzînd respectiv numărului șoarecilor ce au murit și cifrele corespunzînd numărului șoarecilor ce au supraviețuit. Punctul de intersecție a celor două linii dă procentul 50%, a cărui valoare este citită pe scară logaritmică.



Scanned with OKEN Scanner

ORIGINEA INFECŢIILOR

Apariţia microbilor coincide, foarte probabil, cu apariţia pe pămînt a primelor forme celulare de viaţă. Această afirmaţie se sprijină în primul rînd pe constatarea că fosile de bacterii şi ciuperci s-au găsit în cele mai vechi straturi ale paleozoicului, iar în al doilea rînd pe simplitatea structurii formelor microbiene, simplitate care le situează printre cele mai primitive vieţuitoare celulare.

Apărînd înaintea gazdelor receptive, microbii au trebuit să fie iniţial, saprofiţi.

Organismele multicelulare au apărut mai tîrziu, dar, o dată cu această apariţie, s-a născut antagonismul dintre microbi şi ele. Microbii, iniţial saprofiţi, în goana lor după izvoare alimentare, au asaltat aceste cetăţi vii care adăposteau şi ascundeau voracităţii lor preţioase comori nutritive, în special proteine şi hidraţi de carbon. Asaltul dat asupra macroorganismelor de către microorganisme a putut provoca iniţial numeroase victime, a putut duce la distrugerea unor specii chiar în momentul cînd se năşteau sau curînd după naştere, dar, în acelaşi timp, a creat la plante şi la animale sistemul defensiv antimicrobian care prezintă o organizare uimitor de adaptată scopului urmărit sau mai precis cauzei care a adus la construirea sa.

Microbii însă nu au rămas impasibili şi pe măsură ce aparatul defensiv al macroorganismelor se perfecţiona, în aceeaşi măsură ei îşi amplificau şi îşi îmbunătăţeau mijloace de agresiune.

In cursul acestei lupte acerbe, dusă în întunericul îndelungatelor epoci geologice, cele două lumi, animală şi microbiană, şi-au perfecţionat treptat, una mijloacele de apărare, cealaltă mijloacele de agresiune, dar cu toate aceste eforturi nici animalele nu şi-au putut organiza un sistem defensiv infailibil şi nici microbii mijloace implacabile de invazie.

Aceste poziţii ocupate de cele două lumi au făcut ca în natură să existe infecţii, să se păstreze, cu alte cuvinte, germenii patogeni, care, profitînd de deficienţele apărării organice, se strecoară în intimitatea ţesuturilor provocînd o infecţie. Judecînd după ravagiile produse de invaziile microbiene în timpuri istorice este foarte probabil că animalele şi plantele au plătit, în toate timpurile şi în toate erele geologice, un important

tribut infecţiilor. Epidemiile trebuie să fi constituit, în acele timpuri, adevărate catastrofe care se soldau cu distrugeri cvasitotale ale unor specii de animale de pe vaste întinderi.

De cîte ori poate specia umană, în decursul celor 500 000 de ani de existenţă inconştientă, nu a fost substanţial rărită în membrii ei componenţi, printre altele, de către diversele epidemii ale acelor timpuri.

Dar omul şi speciile animale (acelea care au ajuns pînă la noi) nu au fost total distruşi de diversele epidemii şi indivizii rămaşi şi deveniţi rezistenţi faţă de infecţia distrugătoare puteau reproduce mai departe specia. Microbii, în aceste condiţii, şi în lipsa unor gazde receptive, nu se mai puteau înmulţi activ şi produce infecţii, dar se camuflau în organismele unor animale nereceptive, unde duceau o viaţă latentă, se modificau, pierdeau unele proprietăţi de patogenitate şi unii din ei, probabil, dispăreau. Se instala, astfel, o perioadă de acalmie, în care specia animală se multiplica, pentru ca la un moment dat acelaşi flagel sau altul să-i secere o mare parte din membrii componenţi. Aceste urcuşuri şi coborîşuri ale infecţiilor s-au perpetuat pînă în zilele noastre.

În timpurile istorice, începînd cu vechea cultură ebraică şi trecînd prin antichitatea greacă şi romană, infecţiile au prezentat, la fel, momente de extensiune şi momente de retragere. Ciuma a nimicit în repetate rînduri pe locuitorii cetăţilor elene sau romane. Se citează că, în cursul domniei lui Neron 30 000 de cetăţeni romani au fost omoriţi de această molimă. Ciuma s-a dezlănţuit şi asupra teritoriului romînesc în repetate rînduri şi invaziile din secolele al XVIII-lea şi al XIX-lea sînt mai bine cunoscute.

Valul de ciumă din 1718, de exemplu, a ucis în Transilvania 100 000 de oameni din cei 800 000 pe care îi avea această provincie la acea vreme, cel din 1738—1739, 42 000 de oameni tot în Transilvania, iar cel din 1813 din Muntenia 70 000 de oameni. Valurile epizootice sînt mai puţin cunoscute din punct de vedere statistic, dar ele au existat. Astfel, epizootiile de antrax la animale sînt semnalate în tablele lui Moise, în Iliada lui Homer şi în operele lui Seneca, Ovidiu şi Pliniu. Poetul roman Virgiliu descrie epizootii de antrax la oi şi arată caracterul zoonotic al infecţiei. Aceste epizootii s-au prelungit din antichitate şi pînă la noi, ele fiind semnalate în scrierile diverselor epoci. În letopiseţul lui Nicon din 979 se semnalează, printre alte nenorociri ivite în Rusia din acea perioadă, şi boli la animale. La fel, letopiseţul din Tversk, în anul 1158, arată că bolile au secerat, în acelaşi timp, oameni, cai şi vite cornute. În Ţările Romîneşti se semnalează o epizootie gravă de antrax printre oi în anul 1807.

Rezultă, din datele găsite în documentele diverselor epoci istorice, că unele infecţii umane sau animale, ca antraxul, turbarea, tuberculoza, variola, sînt vechi cunoştinţe ale oamenilor şi că ele au fost prezente în cursul întregii perioade istorice a umanităţii. Alte infecţii însă au luat extindere, au căpătat caracter epizootic în timpurile noastre. Agenţii etiologici ai acestor din urmă infecţii au existat, foarte probabil, înainte ca noi să cunoaştem boala pe care o produc, dar ei au fost cantonaţi în zone restrînse, localizaţi pe un număr limitat de animale sălbatice, constituind focare naturale de boală, în sensul definiţiei lui P a v l o v s k i. Sifilisul, de exemplu, nu era cunoscut în vechiul continent pînă la descoperirea Americii, cînd navigatorii îl duc de la oamenii noului continent şi-l răspîndesc în toate ţările Europei.

Scanned with OKEN Scanner

Pesta porcină este, după cum se pare, tot o infecție venită din noul continent. Dar chiar aici ea era necunoscută pînă în 1833, cînd primele focare se semnalară în statul Ohio. De aici însă, treptat, infecția s-a răspîndit în toate țările globului. Tot relativ recent au apărut și s-au extins, cucerind arii geografice din ce în ce mai întinse, bruceloza, tularemia, unele rickettsioze etc.

Aceste diverse infecții au stat cantonate în zone restrînse mii de ani, pentru ca deodată, prin dezvoltarea unor noi activități umane (cucerirea unor noi zone de exploatare, lărgirea schimburilor comerciale) sau prin extinderea unor rase de animale de mare producție (bruceloza, de exemplu, a difuzat o dată cu vacile producătoare de lapte) să asistăm la o extindere a lor, la apariția unor infecții capabile să producă pierderi imense în lumea umană și animală și să pună frîne în calea procesului de producție. Sînt deci infecții care au apărut și au căpătat un caracter grav sub ochii noștri. Această constatare, făcută de numeroși cercetători, a rămas fără nici o aplicație practică, ea fiind doar un prilej pentru speculații și jocuri literare.

Este meritul lui Pavlovski de a fi atras atenția asupra faptului că ceea ce s-a întîmplat în trecutul apropiat se mai poate repeta în zilele noastre. Pavlovski a arătat, în acest sens, că sub forma de focare naturale există încă multe infecții și numeroși agenți patogeni și că acești agenți pot fi răspîndiți pe întinderi mari, creîndu-se noi boli infecțioase, dacă nu se iau măsuri potrivite de prevenire. Bacterii sau virusuri patogene necunoscute se pot găsi la animalele sălbatice care populează arii geografice restrînse, situate în regiuni neexploatate încă de om. Cercetătorii sovietici Silber, Smorodințev și Kroli au pus, de exemplu, în evidență existența unor focare naturale de encefalită în taiga siberiană.

Animalele purtătoare al acestui virus pot face forme acute sau latente de boală. Omul sau animalele care însoțesc pe om, ajunși în contact cu purătorii de virus, se pot îmbolnăvi. In plus, omul sau animalele de largă exploatare pot vehicula acești microbi în afara zonei focarului natural. Vehicularea se poate face în cele mai diferite moduri. Astfel, omul poate face forma inaparentă a bolii respective și elimina lung timp virusul. Virusul poate fi transportat prin produsele animalelor sălbatice purtătoare (blănuri) ; omul sau animalele pot vehicula insectele hematofage purtătoare ale agentului etiologic.

Insectele hematofage pot constitui ele însești un important izvor de virus. In cazul encefalitei de taiga, s-a dovedit că virusul respectiv se conservă în căpușe și se transmite transovarian de la căpușele infectate la descendenții lor.

Incadrarea unui nou teritoriu în circulația economică mondială nu se poate face, așa cum a arătat Pavlovski, fără a ține seama de posibilitatea existenței unor focare naturale de boală și fără a lua măsuri care să împiedice difuziunea eventualilor germeni patogeni și apoi, pe cît posibil, distrugerea lor chiar în focare naturale.

In cazul encefalitei de taiga, tăierea pădurilor și tufișurilor, și distrugerea animalelor sălbatice au dus la reducerea cazurilor de îmbolnăviri, au redus forța epidemică a focarului natural. La fel, în cazul leishmanio-

Scanned with OKEN Scanner

zei umane din deşert s-au obţinut rezultate pozitive de către Latasev şi colaboratorii prin distrugerea popîndăilor (purtătorii agenţilor patogeni) şi a ţînţarilor transmiţători ai infecţiei de la popîndăi la om. Intr-un raion turcmen numai prin distrugerea popîndăilor s-a redus procentul de infecţie de la 70 la 0,49%.

Dacă este adevărat că în perioada istorică a umanităţii infecţii noi s-au răspîndit şi au cîştigat întinse regiuni, apoi tot aşa de adevărat este că unele infecţii vechi au dispărut sau s-au restrîns pe arii geografice limitate. Astfel, în urma măsurilor sanitare, ciuma şi holera umană sînt astăzi limitate la unele regiuni din Asia, vărsatul uman care făcea, pînă în ultimul secol, numeroase victime, este pe cale de dispariţie. La animale am asistat la retranşarea pestei bovine, peripneumoniei bovine, morvei la cabaline etc. Aceste infecţii limitate astăzi se pot întinde din nou dacă măsurile de îngrădire şi de lichidare a lor ar fi suspendate.

Microbii patogeni zooparaziţi s-au născut, foarte probabil, din germeni saprofiţi în primele ere zoologice, în cursul luptei dintre lumea vizibilă şi invizibilă. Infecţiile s-au născut o dată cu microbii patogeni şi în lunga lor evoluţie au prezentat foarte probabil momente de exaltare şi de atenuare. Medicina de astăzi ne dă aspectul actual al luptei dintre microbii patogeni şi lumea animală. Acest aspect nu a fost acelaşi în trecut şi nu va fi acelaşi în viitor. Lumea microbiană şi lumea animală sînt într-o continuă schimbare şi aceste schimbări creează noi raporturi dintre macro- şi microorganisme, duc la dispariţia unor infecţii şi la apariţia altora. Acest proces de apariţie şi dispariţie a infecţiilor este însă din ce în ce mai mult stăpînit de om care intervine activ, înlesnind dispariţia principalelor boli şi frînînd apariţia unor boli noi. Procesul naşterii infecţiilor nu mai este lăsat la voia întîmplării şi acest fapt va modifica mersul normal al evoluţiei antagonismului dintre cele două lumi în favoarea omului şi macroorganismelor utile lui.

In încheiere, se poate pune întrebarea dacă nu cumva noi microbi patogeni se pot naşte din actualii saprofiţi. Această generare a unor noi specii patogene este desigur posibilă şi naturală, dar se pare că ea nu se poate întîmpla astăzi în mod curent, nici în natură, nici în condiţiile de laborator.

Incercările de a transforma, în laborator, unele bacterii saprofite în patogene au rămas, pînă în prezent, fără rezultat sau cu rezultate îndoielnice şi contestate, dar aceste încercări au fost făcute pe o scară prea redusă, nu au epuizat toate mijloacele de acţiune asupra microbilor, astfel ca, pe baza lor, nu se poate trage o concluzie definitivă.

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA a V-a

ELEMENTE DE IMUNOLOGIE

Scanned with OKEN Scanner

DEZVOLTAREA IMUNOLOGIEI

Stările de rezistență față de unele boli de natură infecțioasă sînt cunoscute de foarte multă vreme. Cele mai vechi scrieri din antichitatea chineză, hindusă, egipteană, ebraică, greacă notează că anumite stări morbide nu recidivează și că omul se poate obișnui cu anumite substanțe toxice — veninul șerpilor, otrava unor ciuperci, de exemplu — sau poate deveni rezistent față de diverse boli extrem de periculoase. Tukidide (secolul al V-lea î.e.n.), în istoria războiului din Peloponez, descrie, de exemplu, o gravă epidemie care a bîntuit printre soldați și semnalează că oamenii care s-au îmbolnăvit și s-au vindecat de ciumă erau rezistenți și puteau fi folosiți, fără a le periclita viața, la îngroparea cadavrelor. Acest lucru o dată cunoscut intră atît de adînc în conștiința umană, încît în evul mediu era ca ceva de la sine înțeles că numai oamenii care au suferit de ciumă și s-au vindecat pot fi folosiți la îngroparea cadavrelor, curățirea locuințelor în care fuseseră cadavre etc.

Oamenii au încercat chiar să aplice aceste cunoștințe în prevenirea unor boli la animale sau om; variolizarea oilor se practica de multă vreme pe meleagurile noastre și această operație nu este altceva decît o aplicare a unor observații milenare. La fel de vechi, sau poate încă și mai vechi, sînt încercările de a imuniza oamenii contra vărsatului. Chinezii se pare că aplicau vaccinarea contra vărsatului încă din secolul al IX-lea î.e.n. În acest scop, ei introduceau cruste variolice în nasul oamenilor sau le insuflau praf de cruste variolice pisate. În Gruzia, după Silber, în scopul vaccinării antivariolice se găurea pielea omului cu ace muiate în pustula variolică. Acest procedeu se aplica, pînă nu de mult, de ciobanii noștri în vaccinarea oilor contra vărsatului, ceea ce arată că această metodă era răspîndită pe întinse arii geografice.

Mai tîrziu, în timpurile moderne, cunoștințele în această direcție s-au înmulțit și medicina a trecut la aplicarea lor pe o scară mai largă și în condiții mai bune. În acest sens, amintim, în primul rînd, vaccinarea omului contra vărsatului cu virusul variolei bovine, la care ajunge Jenner în 1798. Acest cercetător, plecînd de la observațiile făcute de îngrijitorii de vaci din Gloucester, întrezărește posibilitatea imunizării omului contra vărsatului cu virusul variolei bovine, mult mai puțin periculos ca virusul

Edward Jenner (1749—1823)

variolei umane, şi, în urma cercetărilor sale instituie metoda de vaccinare care se foloseşte şi în zilele noastre şi care a dat rezultate foarte bune, în sensul că a dus la dispariţia aproape totală a variolei umane. Identificarea agenţilor etiologici ai diverselor infecţii a permis prepararea unor noi vaccinuri. În primul rînd, Pasteur descoperă vaccinul antiholeric şi vaccinul anticărbunos, apoi vaccinurile antirabic, antirujetic etc. Cercetările lui Pasteur stabilesc, în mod definitiv, că pot fi obţinute, în laborator, anumite forme de microbi care nu numai că pot fi injectate fără pericol la om şi animale, dar o dată injectate ele conferă o stare de rezistenţă faţă de formele microbiene patogene. Acest principiu general o dată cucerit, extinderea cercetărilor privind găsirea unor microbi vaccinanţi apare ca un fenomen logic.

Descoperirea vaccinurilor este urmată de o altă descoperire tot aşa de importantă, şi anume descoperirea serurilor imune. S-a constatat, într-adevăr, intîi în special de Babeş (1887), apoi de Behring (1890), că serul saguin al unui animal sau al unui om care a fost vaccinat sau care a suferit de o infecţie conţine substanţe antiinfecţioase, substanţe care previn sau chiar vindecă o infecţie. Seroprevenţia şi seroterapia erau astfel descoperite.

Cercetările rămîn totuşi într-un cadru empiric şi, fiind lipsite de o bază teoretică solidă, nu pot ajunge la o dezvoltare care să acopere necesităţile practice şi nu pot constitui bazele unei ştiinţe. Ridicarea studiului stărilor de rezistenţă la rangul de ştiinţă — ştiinţa imunologiei — o datorăm, în primul rînd, eminentului savant Ilia Mecinikov. Cercetările sale (1883), primele în acest sens, stabilesc unele din cauzele cărora se datoreşte rezistenţa unui organism faţă de un microb. Ele arată că, în mare parte, această rezistenţă este datorită capacităţii fagocitare a unor anumite celule ale organismului. Fenomenul de fagocitoză şi teoria fagocitară a imunităţii iau astfel naştere, iar imunologia devine astfel o ştiinţă. Ea cercetează totalitatea fenomenelor organice care asigură apărarea organismului faţă de substanţe care îi sînt străine compoziţiei proprii şi care,

Scanned with OKEN Scanner

pătrunzînd în intimitatea ţesuturilor, exercită o acţiune iritativă. Cercetările lui Mecinikov au fost dezvoltate şi completate. S-a stabilit, în cursul acestor cercetări, că, alături de factori celulari, există şi factori umorali care intervin în procesul de apărare organică şi care se găsesc în toate ţesuturile şi mai ales în serul sanguin. Alături de teoria celulară, Bordet dezvoltă teoria umorală a imunităţii Aceasta din urmă, aşa cum observa Gamaleia (1954), a fost mult mai bogată în rezultate pentru practică. Ea a dus la prepararea serurilor imune şi la introducerea metodelor serologice de diagnostic. Serurile imune şi diagnosticul serologic au fost şi sînt doi factori importanţi în combaterea bolilor microbiene.

In dezvoltarea imunologiei moderne, se pot distinge trei faze şi anume: pasteuriană, mecinikoviană şi actuală.

Faza pasteuriană se caracterizează prin aceea că ea condiţionează şi încadrează procesele imunologice în legile biologiei microorganismelor. Pentru Pasteur, microorganismul era singurul element al infecţiei, macroorganismul fiind un spectator pasiv în acest proces. Pornind de la o asemenea concepţie, Pasteur explică imunitatea prin epuizarea, în cursul infecţiei, a substanţelor nutritive necesare multiplicării microorganismelor. Macroorganismul, epuizat de anumite substanţe, prin însuşi microorganismul, patogen sau vaccinal, nu mai este un mediu propice dezvoltării microbului respectiv, care în consecinţă, nu se mai poate multiplica şi deci nu mai poate produce infecţia. Afirmaţia lui Pasteur era, totuşi, în parte justă şi anume este just că germenul nu se mai poate multiplica într-un organism imun, dar această multiplicare nu este împiedicată, aşa cum spunea Pasteur, de lipsa de materii nutritive, ci de substanţe active care s-au produs în organism în cursul procesului de imunizare.

Faza mecinikoviană se caracterizează prin considerarea, de către Mecinikov, a organismului animal ca factor important atît în evoluţia infecţiei cît şi în procesele de imunitate consecutive. Organismul, în concepţia lui Mecinikov, nu mai este un spectator pasiv în procesul de infecţie, ci un factor activ şi proba acestei activităţii se găseşte în însăşi imunitatea care rezultă, în reacţiile care se produc în organism, reacţii care duc la distrugerea germenului, la punerea sa în imposibilitate de a se multiplica în ţesuturi.

Faza actuală se caracterizează prin ieşirea imunologiei din cadrul microbiologiei, ea constituind o ştiinţă separată. Ea nu se ocupă astăzi numai de raporturile dintre macro- şi microorganisme, ci cercetează şi alte substanţe care nu sînt de origine microbiană, dar care produc reacţii de imunitate în macrooganism. Imunologia actuală se încadrează în legile biologiei miciuriniste şi fiziologiei pavloviste. Ea vede, conform principiilor miciuriniste, în orice reacţie de imunitate o tendinţă de adaptare la noi condiţii de mediu, iar de acord cu principiile pavloviste, ea afirmă că orice reacţie de imunitate este un proces fiziologic al întregului organism, proces condus de sistemul nervos şi prin care se urmăreşte conservarea constantei mediului intern al organismului. Procesele de imunitate, spre deosebire de alte procese fiziologice, cum sînt cele metabolice, de exemplu,

au un caracter special şi accidental, dar acest lucru nu constituie un impediment pentru încadrarea lor în legile şi mecanismele fiziologice generale ale organismului şi cercetarea lor nu poate fi separată de studiul fenomenelor fiziologice din organismul în care ele apar (Zdrodovski, 1952).

Privind fenomenele de imunitate prin prisma concepţiilor materialismului dialectic, a legii unităţii organismului cu mediul şi a primatului sistemului nervos şi îndepărtîndu-ne de dogmele metafizice, vom ajunge la o înţelegere justă a proceselor de imunitate.

Imunologia a adus şi aduce nepreţuite servicii umanităţii şi economiei. Astfel, dezvoltarea imunologiei a contribuit, alături de măsurile sanitare şi de îmbunătăţire a condiţiilor igienice generale, la scăderea mortalităţii infantile, la prelungirea mediei vîrstei la specia umană etc. Dispariţia de pe întinse teritorii populate a unor grave infecţii umane (variola, ciuma şi holera) sau animale (pesta şi pleuropneumonia taurinelor) se datoreşte şi dezvoltării imunologiei. Este de amintit că aceste infecţii provocau pierderi imense în trecut. Datele statistice pe care le avem şi care privesc ţara noastră arată, de exemplu, că ciuma din 1817 a provocat peste 100 000 de victime în Transilvania, cea din 1738—1739, 42 000. ciuma lui Caragea, din 1818, a făcut peste 70 000 de victime, iar cea din 1828—1830, 36 000. Holera a invadat ţara noastră în mai multe rînduri (1831, 1848, 1855, 1865, 1866, 1872, 1893, 1913), cauzînd numeroase pierderi de vieţi omeneşti. Nu avem date privind pierderile provocate de diversele epizootii la animale, dar ele trebuie să fie încă şi mai impresionante ca la om.

Metodele de vaccinare sînt introduse de multă vreme în ţara noastră. Astfel, vaccinarea contra variolei începe a fi făcută de medicii Caracaş (tatăl), Silvestru, Filoti şi C. Darvari încă din anul 1800 şi ele sînt generalizate, sub Regulamentul Organic, în 1831 în Muntenia şi 1832 în Moldova.

Vaccinuri pentru prevenirea bolilor la animale încep a se fabrica în lume pe la sfîrşitul secolului al XIX-lea şi ele sînt introduse în Ţările Romîneşti la începutul secolului al XX-lea. In extinderea vaccinării profilactice a animalelor ca şi a folosirii serurilor imune în prevenţia şi terapia diverselor infecţii animale, Paul Riegler are merite deosebite. El a folosit întîi produse de import pentru ca apoi, în scurt timp, să pună bazele unei industrii de stat pentru prepararea produselor biologice.

Imunologia practică veterinară a luat, în anii puterii democrat-populare, o extindere necunoscută în trecut. Cantităţile de seruri şi vaccinuri care se folosesc astăzi pe teren, în scopul combaterii bolilor infecţioase ale animalelor, depăşesc cu mult cantităţile folosite înainte de 1944. Astfel, cantitatea de produse biologice folosită în 1952 a fost de 17 ori mai mare ca aceea întrebuinţată în 1938 şi de 9 ori mai mare ca aceea din 1948. In plus, produse noi şi din ce în ce mai eficace sînt date practicii veterinare. In aceste condiţii, succesele obţinute în combaterea bolilor infectocontagioase ale animalelor sînt din ce în ce mai mari, iar pierderile se reduc simţitor de la un an la altul. Astfel, pentru a da un exemplu, pierderile datorite infecţiei cărbunoase la animale s-au redus în 1952, cu 91,7% în raport cu

Scanned with OKEN Scanner

anul 1938. Această reducere se datorește, în primul rînd, folosirii pe o scară din ce în ce mai întinsă a vaccinurilor anticărbunoase. Numărul vaccinărilor anticărbunoase a crescut în 1952 cu 1 087,5% față de anul 1938. Aceste cifre ilustrează atît progresul realizat în țara noastră în domeniul bolilor la animale, cît și valoarea metodelor imunologice de combatere.

Scanned with OKEN Scanner

FACTORI NORMALI DE IMUNITATE

Organismele multicelulare dispun de un sistem defensiv antimicrobian, căci dată fiind răspîndirea microbilor în biosfera planetară şi tendinţele lor invazive, existenţa organismelor pluricelulare, în absenţa acestui sistem defensiv, nu ar fi posibilă.

Sistemul defensiv antimicrobian s-a născut în întunericul epocilor geologice, în cursul luptei duse între macro- şi microorganisme. El reprezintă rezultatul adaptării la mediu, adaptare realizată în cursul a milioane de ani de evoluţie a organismelor. Sistemul defensiv antimicrobian este constituit din :

1. factori pasivi — pielea şi mucoasele ;
2. factori activi.

Factorii activi pot fi împărţiţi în două grupe şi anume :

a) factori activi de natură umorală ;
b) factori activi de natură celulară.

Să examinăm aceşti diverşi factori.

FACTORII PASIVI DE APĂRARE

Factorii pasivi de apărare antimicrobiană pot fi socotiţi pielea şi mucoasele, care intervin în procesul de apărare, atît prin structura lor mecanică, cît şi prin alte însuşiri. Structura mecanică a pielii şi mucoaselor se opune pătrunderii microbilor sau altor factori din mediu. O serie întreagă de microbi nu pot, într-adevăr, traversa pielea sau mucoasele intacte. Virusul rabic, de exemplu, nu produce infecţia nici cînd este pus pe pielea intactă şi nici cînd este ingerat pe cale bucală. Alţi germeni, de asemenea, nu pot traversa pielea, dar traversează mucoasele. Astfel, bacilul tuberculozei nu produce infecţia cînd este pus pe pielea cobaiului, dar o produce cînd este depus pe mucoasa conjunctivă sau cînd este ingerat sau inhalat. Alţi germeni, cum sînt *Brucella abortus, Pasteurella tularensis* etc., traversează chiar pielea intactă. In general, pielea constituie o barieră antimicrobiană mai severă decît mucoasele şi traversarea ei de către microbi se face neregulat, chiar în cazul speciilor considerate capabile să o traverseze.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetările experimentale au arătat că pielea, pe lîngă această acțiune de protecție pasivă, exercită și o acțiune destructivă directă asupra unor microbi. Astfel, o serie de germeni cum sînt cei din grupurile *Salmonella, Proteus* etc. se distrug cînd sînt depuși pe pielea omului. Într-adevăr, numărul lor scade, în raport cu punctul de plecare, foarte repede și chiar după 15 minute germenii se reduc simțitor, pentru a dispărea cu desăvîrșire în cîteva ore. Unii germeni însă, cum sînt stafilococii, se conservă pe piele, ceea ce explică frecvența leziunilor cutanate de natură stafilococică. Pielea diverselor regiuni ale corpului nu este egal de bactericidă. Pielea de pe fața palmei, de exemplu, este mai activă ca cea de pe dosul mîinii.

Gradul de curățenie, deci de integritate funcțională, influențează, la fel, activitatea bactericidă a pielii. Astfel, pielea curată este mai activă decît cea murdară.

Activitatea bactericidă dispare repede după moarte.

Cercetările făcute cu scopul de a lămuri această acțiune bactericidă au arătat că ea se datorește secrețiilor normale ale pielii și acidității stratului cornos superficial. pH-ul acestui strat este, într-adevăr, foarte redus, atingînd cifra 3—4.

Secrețiile mucoaselor intervin și ele în procesul defensiv. Astfel, secreția de acid clorhidric de către mucoasa gastrică este un factor important de apărare antimicrobiană. O serie de microbi sînt distruși în stomac de aciditatea conținutului. Totuși, unii germeni cum sînt salmonelele rezistă și, din această cauză, ei produc infecții pe cale bucală, prin ingestie.

FACTORII ACTIVI DE APĂRARE

FACTORI ACTIVI DE NATURĂ UMORALĂ

Lizosima. Umorile și țesuturile organismelor vii oferă, prin compoziția lor chimică, bune condiții de dezvoltare la o serie întreagă de specii bacteriene patogene sau saprofite. Dacă organismele vii, în stare normală, sînt sterile, aceasta se datorește unui complex de factori care se opun atît pătrunderii, cît și multiplicării bacteriilor în țesuturi. Am văzut deja că mucoasele, prin structura lor, sînt mai permeabile față de microbi decît pielea. Mucoasele însă, pe lîngă structura lor mecanică, exercită o acțiune antimicrobiană și prin unele secreții. Aceste secreții, pe lîngă alte funcțiuni fiziologice, îndeplinesc și funcțiuni defensive. În acest mod se comportă lacrimile pentru mucoasa conjunctivală, diverse secreții nazale și bucale pentru mucoasele respective, secreția vaginală pentru mucoasa acestui orificiu etc. Este cunoscut faptul că o stare morbidă localizată pe mucoase este însoțită de secreții abundente. Acestea, dacă starea morbidă se datorește unei infecții microbiene, diluează și spală, în mod mecanic, germenii. În 1922, F l e m i n g a arătat că aceste secreții, în afară de acțiunea lor antiinfecțioasă, de natură mecanică, conțin și un principiu bactericid extrem de activ, mai ales față de germenii saprofiți. Cercetări amănunțite au dovedit că acest principiu numit lizosimă este răspîndit la aproximativ toate speciile din scara animală și chiar la unele bacterii și plante, iar la aceeași specie nu îl găsim numai în secrețiile ce umectează

Scanned with OKEN Scanner

diversele mucoase, ci şi în umorile din interiorul organismului. La om şi la animalele superioare, lizosima se găseşte, de exemplu, în plasma sanguină, serul sanguin, lacrimi, salivă, mucus nazal, lichid pleural, lichid ascitic, puroi, lichidul chiştilor ovarieni şi parotidieni, în ficat, rinichi, amigdale, intestin, stomac, meninge şi piele; este absentă însă în lichidul cerebrospinal, urina normală şi materiile fecale. Laptele de femeie este foarte bogat în acest principiu litic, în timp ce laptele de vacă este complet lipsit de lizosimă. Faptul că copiii alăptaţi la sîn suferă mai puţin de afecţiuni intestinale, în comparaţie cu cei hrăniţi cu lapte de vacă, se datoreşte, probabil, prezenţei acestui principiu în laptele de femeie.

Concentraţia acestui principiu în diverse lichide sau ţesuturi animale variază în limite foarte largi. Astfel, lichidul ascitic produce o liză completă a unei suspensii de *Micrococcus lysodeicticus* în diluţie de 1/8, în timp ce lacrimile provoacă acelaşi efect în diluţii de 1/40 000, mucusul nazal în diluţie de 1/13 500, iar albuşul de ou — de altfel produsul organic cel mai bogat în lizosimă — este activ chiar în diluţie de 1/60 000 000.

Sensibilitatea diverselor specii bacteriene nu este egală faţă de lizosimă. Cea mai sensibilă specie este un coc Gram pozitiv, *Micrococcus lysodeicticus,* izolat din mucusul nazal al bolnavilor de coriză. Proba bogăţiei unui lichid în lizosimă se face, pentru acest motiv, pe acest germen. Alţi germeni au o sensibilitate mai puţin pronunţată. In general, germenii Gram negativi rezistă mult mai bine ca cei Gram pozitivi, invers deci de ceea ce se observă în liza provocată de bacteriofag. Germenii patogeni sînt mai puţin sensibili la acţiunea litică a lizosimei ca cei saprofiţi, deşi nu au toţi o rezistenţă absolută. Astfel, streptococul hemolitic, stafilococul piogen, *Brucella abortus,* gonococul, bacteridia cărbunelui, vibrionul septic, *Bacillus perfringens* etc. pot fi lizaţi de lizosimă.

I. Mesrobeanu şi colaboratorii (1950) constată că tulpinile patogene de stafilococ sînt mai rezistente faţă de lizosimă decît cele saprofite (stafilococii citrini). Mai mult încă, stafilococii patogeni care, prin contact cu penicilina, au devenit citrini, pierzînd totodată şi unele caractere ale patogenităţii (secreţia de hemolizine, coagulaze, hialuronidaza, manitaza etc.), devin sensibili la lizosimă.

Acţiunea litică a lizosimei se manifestă în limite de temperatură foarte largi, 4—65°C, dar activitatea ei este cu atît mai pronunţată cu cît temperatura creşte de la 0 la 60°C. Aciditatea şi alcalinitatea împiedică acţiunea lizosimei care se manifestă, în condiţii optime, într-un mediu cu reacţie neutră. Unele antiseptice împiedică liza. Astfel, bacteriile tratate cu alcool devin lizosimorezistente, dar cele omorîte prin cloroform, sublimat, fenol nu pierd nimic din sensibilitatea lor iniţială.

Cercetările făcute cu scopul de a obţine o lizosimă în stare pură au dovedit că ea este o diastază de natură proteică. Ea a fost obţinută sub formă cristalizată şi s-a dovedit că are o greutate moleculară de aproximativ 17 000, deci mult mai mică decît globulinele anticorp, iar punctul izoelectric este la pH = 10,5 şi 11. Lizosima purificată dă reacţia albuminelor, conţine azot, sulf şi fosfor. Se distruge la 70°C. Acţiunea ei litică ar fi datorită descompunerii substanţelor hidrocarbonate ce se găsesc în membrana bacteriană. In acest sens se constată că în urma acţiunii lizosimei asupra mucoidelor izolate din *Sarcina lutea* se pune în libertate

Scanned with OKEN Scanner

zahăr reductor. Deşi atacă substanţele hidrocarbonate aparţinînd unor specii bacteriene, lizosima este inactivă faţă de amidon, glicogen, mucină gastrică, mucoidul izolat de la variante mucoase de *Escherichia coli* etc. Lizosima se epuizează în cursul lizei: o diluţie de albuş de ou nu poate topi o cantitate infinită de bacterii. Lizosima, spre deosebire de bacteriofag, pare a fi lipsită de calităţi antigenice. Unii autori susţin însă că au obtinut seruri precipitante faţă de ea.

Funcţiunile acestui principiu, în apărarea organismului faţă de bacterii, sînt din cele mai importante. La copii, ea împiedică multiplicarea peste măsură a germenilor din intestin şi copiii alăptaţi la sîn o elimină, în mod constant, prin materiile fecale. Lizosima poate fi folosită şi în scop terapeutic şi Melnik afirmă, în acest sens, că în Rusia se combătea, încă de mult timp, diareea la copii prin albuş de ou de găină amestecat cu apă.

In U.R.S.S., preparatele de lizosimă au unele întrebuinţări în terapia diverselor infecţii ale animalelor ca: diareea nou-născuţilor, vaginita granuloasă a vacilor, metrite etc. (Nikolaevski, 1950). In afecţiunile intestinale preparatul se administrează per os, în vaginite sau metrite pe cale vaginală (aplicarea unor tampoane de vată îmbibate sau spălături cu lizosimă).

Lizosima, pentru aplicaţii terapeutice, se prepară din ou de găină. In acest scop, ouăle proaspete sînt spălate cu apă şi săpun, dezinfectate cu alcool şi sparte pentru a recolta albuşul. Albuşul se omogenizează cu perle şi se diluează în soluţie tampon (6,8 g de monofosfat de sodiu, 8 g NaCl şi 20 g de acid boric la 1 litru de apă distilată) în proporţie de 150 g de albuş pentru 1 litru de soluţie. Amestecul se inactivează la 56°C timp de 30 de minute şi se filtrează. Se ajustează pH-ul filtratului la 7,2—7,4 şi el constituie lizosima activă. Ea se conservă, sterilă şi la rece, timp de cel puţin 1 an.

Alexina. Incepînd din anul 1881, o serie de cercetători au observat că sîngele se putrefiază, adică se lasă invadat de bacteriile de putrefacţie, mai greu decît alte lichide şi ţesuturi. Această rezistenţă se datoreşte, aşa cum a arătat Buchner, prezenţei în sînge a unui principiu bactericid care a fost numit şi este cunoscut sub numele de alexină sau complement. Cercetările, după această descoperire, au continuat, precizîndu-se, în parte, proprietăţile fizice, chimice şi biologice ale acestui interesant principiu defensiv. Cu toate că s-au făcut, în scopul cunoaşterii alexinei, extrem de numeroase cercetări, nu avem nici astăzi despre ea o imagine totală şi completă.

Răspîndire. Alexina este, în primul rînd, o substanţă care se găseşte în sînge, în plasmă şi în serul sanguin al animalelor cu sînge rece sau cald. Nu a fost găsită în hemolimfa insectelor. La vertebrate, în afară de sînge, alexina este pusă în evidenţă şi în diversele exudate (pleural, peritoneal), dar nu se găseşte în lichidul cefalorahidian, în lichidul din camera anterioară a ochiului, în lichidul sinovial şi în lichidul edemelor. Apare scurt timp după naştere (imediat la cobai, după 3—4 săptămîni la purcei, 5—7 săptămîni la şobolani) şi nu este influenţată cantitativ şi calitativ de vîrstă.

Conţinutul în alexină al serului sanguin variază în raport cu starea fiziologică a animalului. Serul cobailor cu carenţe alimentare conţine mai

puţină alexină decît serul cobailor normali (Negulescu Al.). Animalele cu leziuni hepatice au un ser sanguin sărac în alexină. Titrul alexic al serului scade şi în cursul bolilor infecţioase. Manolov şi Milian (1953) au dovedit că sub influenţa somnului medicamentos se reduce titrul alexic al serului sanguin. Administrarea adrenalinei ridică titrul alexic al serului şi asociind injecţiile de adrenalină cu excitanţi optici, Hadnagy şi colaboratorii (1953) obţin, după 60 de repetări, o urcare a titrului de alexină numai prin acţiunea excitanţilor condiţionaţi. Aceste date demonstrează că în reglarea concentraţiei alexinei din sînge intervine sistemul nervos.

Rezistenţa. Principiul alexic este foarte labil. El se distruge, din serul de cobai, în 30 de minute la 56°C, în 7 ore la 45°C şi în cîteva zile la temperatura camerei. Alexina din serul altor specii animale se distruge mai greu; cea din serul de bou sau din serul de oaie dispare, după o încălzire de 1—2 ore, la 57—59°C. Alexina se distruge sub influenţa razelor solare, a substanţelor chimice (acizi, baze) şi chiar prin simpla diluare a serului cu apă distilată. Agitarea serului, invadarea lui de către bacterii duce, de asemenea, la dispariţia alexinei. Concentraţiile mari de NaCl nu exercită o acţiune nocivă asupra alexinei.

Conservarea acestui principiu în laboratoare prezintă importanţă practică şi s-au făcut numeroase cercetări în scopul conservării constante a titrului alexic al unui ser. Cele mai bune rezultate se obţin prin îngheţare, uscare şi desicare în vid (liofilizare).

Structura alexinei este foarte complexă. Se admitea, iniţial, că ea este o singură substanţă. Cercetările ulterioare au arătat că funcţiunea alexică a unui ser este dată de un grup de patru substanţe. Una din aceste substanţe se separă cu globulinele serice, alta cu albuminele, o a treia fracţiune este termostabilă şi în fine a patra fracţiune, tot termostabilă, care este însă distrusă de amoniac, cloroform, eter etc.

Activitatea alexică a unui ser se datoreşte deci colaborării unui grup de substanţe care se găsesc răspîndite printre proteinele, lipidele şi alţi componenţi ai serului.

Funcţiunile alexinei. Alexina îndeplineşte funcţiuni multiple. Ea are, în primul rînd, funcţiuni litice. Activitatea litică se exercită mai cu seamă asupra bacteriilor saprofite. S-a arătat, în această privinţă că dintre două variante de colibacili, una patogenă şi alta lipsită de patogenitate, alexina lizează numai pe aceasta din urmă (Bordet şi col.). Unii germeni saprofiţi, cum este *Bacillus subtilis,* sînt, la fel, lizaţi de alexină. Alexina are însă o acţiune litică mult mai importantă asupra elementelor figurate care au fost sensibilizate prin anticorpii specifici, aşa cum se va arăta mai tîrziu.

Alte fracţiuni bacteriolitice din serul sanguin. S-au mai descris, în serul sanguin, în afară de alexină, şi alte fracţiuni cu activitate bactericidă, numite lizine. Lizina alfa, de exemplu, este termolabilă, ea distrugîndu-se la 56°C; este activă asupra streptococilor, colibacililor, vibrionului holerei etc. Lizina beta rezistă la 56°C, se distruge însă la 65°C şi este activă faţă de *Bacillus anthracis,* stafilococi, anaerobii gangrenelor gazoase etc.

Relaţiile dintre aceste fracţiuni şi alexină nu sînt încă precizate

Scanned with OKEN Scanner

FACTORI ACTIVI DE NATURĂ CELULARĂ

FAGOCITELE ŞI FAGOCITOZA

Fenomenul de fagocitoză, adică de înglobare şi digestie a microbilor sau particulelor inerte străine, prin compoziţia lor chimică, de organismul în care se efectuează fagocitoza, a fost descoperit de Mecinikov. Este drept că alţi cercetători, înainte de Mecinikov, au observat bacterii incluse în citoplasma leucocitelor, dar ei nu au dat fenomenului o explicaţie justă. Astfel, Klebs şi Waldeier (1870—1872) semnalează prezenţa microbilor în citoplasma unor celule, dar nu atribuie fenomenului un rol în apărarea organismului. R. Koch semnalează şi el acest fapt, dar îi dă o interpretare, în mare parte, greşită. El afirmă că pătrunderea germenilor în citoplasma celulară nu ar înlesni apărarea organismului, ci, dimpotrivă, infecţia lui, căci după autor, prin aceasta celulele contribuie la răspîndirea bacteriilor în diversele ţesuturi. Acest lucru se întîmplă, într-adevăr, în cazul unor bacterii (bacilul tuberculozei), dar nu constituie o regulă generală.

Mecinikov însă, spre deosebire de predecesorii săi, supune observaţia la o riguroasă şi îndelungată cercetare experimentală, dînd fenomenului de înglobare a bacteriilor o interpretare justă. El ajunge la descoperirea fagocitozei plecînd de la studii de morfologie şi fiziologie animală pe care le făcea în vederea verificării teoriilor evoluţioniste ale lui Darwin. Cercetînd diverse specii de animale inferioare împreună cu Kovalevski, el constată că, la unele din aceste animale şi anume la cele lipsite de tub digestiv, nutriţia întregului organism se face cu ajutorul unor celule mobile de origine mezoblastică care plutesc în cavitatea generală. Aceste celule înglobează în protoplasma lor particulele introduse în cavitatea generală şi apoi le digeră, printr-un mecanism asemănător celui cunoscut şi descris la amibe. Digestia se face într-o vacuolă digestivă, care iniţial are un conţinut cu reacţie acidă, iar mai tîrziu, alcalină. În faţa acestor observaţii Mecinikov se întreabă dacă la animalele cu tub digestiv înglobarea bacteriilor de către anumite celule nu cumva reprezintă un fenomen primitiv de nutriţie, care însă realizează şi o apărare a organismului faţă de microbi. În 1883 el face o experienţă tot pe animale inferioare şi anume pe o stea de mare, experienţă care îi permite să pună în evidenţă unele proprietăţi interesante ale celulelor cu funcţiuni nutritive. Mecinikov introduce în cavitatea generală a stelei de mare un spin şi observă că celulele libere din această cavitate se adună în jurul spinului. Celulele acestea au deci sensibilitate, sînt atrase de corpul străin tot aşa cum sînt atrase şi celulele care se găsesc, în cazuri similare, într-un focar inflamator la om sau la un animal. Adunarea celulelor în jurul spinului introdus în cavitatea generală a stelei de mare constituie deci un fenomen inflamator. Această observaţie îi permite să lege procesul inflamator de afluxul celulelor cu însuşiri fagocitare. Mai de parte Mecinikov studiază procesul inflamator în scara animală şi precizează rolul acestui proces în apărarea antimicrobiană.

FAGOCITELE DIN ORGANISMUL ANIMAL

Fagocitele din sînge. Celulele capabile să înglobeze şi să digere bacterii sau alte particule materiale se găsesc în sînge, precum şi în diverse ţesuturi şi organe. Fagocitele din sînge sînt reprezentate prin leucocite. Numărul leucocitelor pe 1 ml de sînge variază de la o specie animală la alta, iar în cadrul aceleiaşi specii se întîlnesc diferenţe de la un individ la altul şi la acelaşi individ de la o stare fiziologică la alta. Iată valorile medii şi variaţiile numărului globulelor albe pe 1 ml la cîteva specii mai importante: om: 6 000—8 000; cal: 7 000—10 000; bou: 5 000—7 000; oaie: 8 000—13 000; porc: 5 000—8 000; cîine: 5 500—8 000; pisică: 6 500—10 000; iepure: 4 000—10 000; cobai: 4 500—6 000; găină: 15 000—40 000.

Morfologic, leucocitele nu sînt uniforme. La mamifere întîlnim trei tipuri principale de globule albe şi anume: 1) limfocite sau mici monocite care se împart, după dimensiuni în două grupe: mici şi mari; 2) mari monocite sau mononucleare şi 3) polinucleare, mai corect, polimorfonucleare sau granulocite.

Raportul numeric dintre diversele celule albe din sînge variază, aşa cum se vede în tabelul 36, la diversele specii animale.

Tabelul 36

Formula leucocitară la cîteva specii animale

Specia animală	Limfocite		Monocite	Polinucleare, polimorfonucleare sau granulocite		
	mici	mari		Neutrofile	Eozinofile	Bazofile
	În procente					
Cal	15—35	1—8	0,3—6	55—65	2—4	0,1—0,6
Bou	35—55	2—8	3—10	25—50	3—8	0—0,5
Oaie	45—60	2—10	1—5	20—45	2—15	0—1
Capră	47—67	2—5	—	30—45	3—8	0—1
Porc	13,1-42,13	1,7—3	0,6—1,5	51,2—81,9	0—1,6	0—0,3
Cîine	12—27	1,5	3—5	60—80	2—4	0,5
Pisică	15—30	2—10	2—4	50—80	2—10	0—0,5
Iepure	35—60	2—9	1—4	Pseudoeozinofile 30—50	1—3	0,5—3
Găină	40—60	5—15	1—4	Pseudoeozinofile 20—50	2—8	1—5

Limfocitele sau *mici monocitele* sînt celule de talie mică, 5 pînă la 10 μ; nucleul ocupă cea mai mare parte din volumul total al celulei; el se colorează intens cu culorile bazice. Protoplasma este reprezentată printr-o fîşie subţire care înconjoară de jur împrejur nucleul. Limfocitele nu conţin oxidaze, dar posedă lipaze. Aceste elemente, avînd puţină citoplasmă, nu sînt apte pentru fagocitoză. Se pare însă că ele îndeplinesc funcţiuni importante în neutralizarea toxinelor şi producţia anticorpilor.

Scanned with OKEN Scanner

Marile monocite sau *mononuclearele* măsoară 12—20 micromi sau mai mult. Ele au un nucleu rotund, puţin scobit, pe o latură, ceea ce îl face să se apropie de forma unei potcoave. Nucleul se colorează uniform şi mai puţin intens ca nucleul limfocitar. Protoplasma este suficient de abundentă şi, din această cauză monocitele sînt apte pentru fagocitoză. Conţin oxidaze.

Polinuclearele, polimorfonuclearele sau *granulocitele* ocupă, la majoritatea speciilor, primul loc în organism şi ca număr şi ca activitate fagocitară. Se deosebesc de limfocite atît prin origine, cît şi prin forma lor. Astfel, în timp ce limfocitele se formează în ganglioni, în foliculii limfatici din splină şi în ţesutul limfoid al aparatului digestiv şi al mucoaselor, polinuclearele iau naştere în măduva osoasă, derivînd din mielocite. Nucleul polinuclearelor este constituit din mai mulţi lobi, 2—5. Această formă a nucleului permite trecerea acestor elemente prin interstiţiile vasculare şi migraţia lor în focarele de infecţie.

Polimorfonuclearele au o protoplasmă abundentă, proprie fagocitozei, în care se observă granulaţii; pentru acest din urmă motiv ele se mai numesc şi granulocite. După afinităţile tinctoriale ale acestor granulaţii, polinuclearele s-au împărţit în trei grupe: a) *neutrofile;* b) *eozinofile* şi c) *bazofile.* Primele sînt cele mai importante, fiind şi cele mai numeroase. Eozinofilele, deşi apte pentru fagocitoză, au o importanţă secundară, fiind puţine la număr, 1—4%, iar bazofilele sînt şi mai puţin numeroase, 0,5%.

Fagocitele din sistemul reticuloendotelial. Sistemul reticuloendotelial este un aparat organic complex, constituit din celule avînd trei caracteristici principale şi anume: 1) originea mezenchimatoasă; 2) capacitatea de adsorbţie pentru substanţe electric negative şi 3) capacitatea de a se elibera din ţesuturi şi de a se regenera. În sens larg, în acest sistem se găsesc două grupe de celule: unele, de regulă, fixe, altele mobile.

Celulele fixe sau celulele raticulare propriu-zise constituie în primul rînd, reticulul fibrilar al organelor hematopoetice, ca splina, ganglionii limfatici, formaţiile limfoide din amigdale, plăcile lui Peyer etc. Din aceeaşi grupă fac parte celulele endoteliale reticulare care se deosebesc de celulele endoteliale ale vaselor sanguine şi limfatice prin bogăţia lor în citoplasmă şi prin capacitatea lor fagocitară. Aceste celule constituie pereţii capilarelor continue sau discontinue (capilarele sinusoide) situate în intimitatea ganglionilor, în splină (pereţii sinusurilor sanguine), în ficat (celulele lui Kupffer), în măduva osoasă, pancreas, pulmon, hipofiză şi, probabil, în toate glandele cu secreţie internă.

Celulele mobile se găsesc în ţesutul conjunctiv din diversele ţesuturi şi organe şi celula tipică de acest fel este histiocitul, descris de Aschoff. Histiocitul este o celulă alungită, cu conturul neregulat şi avînd prelungiri laterale cu ajutorul cărora se mişcă. Histiocitele, aşa cum a arătat Mecinikov, se pot transforma în macrofage, celule avînd o mobilitate destul de vie, datorită prezenţei unei membrane ondulante.

Histiocitul poate deriva din ţesutul conjunctiv. Acesta din urmă, în culturi in vitro, dă două feluri de celule şi anume: 1) *fibrocite* care se transformă în celule tinere, rotunde şi 2) *histiocite.* Celulele lui Kupffer, după Maximov, ca şi celulele endoteliului pulmonar şi chiar celulele musculare se pot transforma, la rîndul lor, în macrofage. Organismul

animal are deci proprietăţi plastice care îi permit să se transforme, sub influenţa factorilor exogeni, să-şi adapteze anumite celule altor funcţiuni decît celor uzuale. Această modificare a funcţiunii unei celule se face, după toate probalităţile, sub conducerea sistemului neurovegetativ, care acţionează prin mediatori chimici, în special, prin acetilcolină.

Tot ca elemente făcînd parte din sistemul reticuloendotelial sînt socotite limfocitele şi monocitele din sîngele circulant. În ceea ce priveşte polinuclearele, ele nu sînt integrate în acest sistem.

Fiziologic, elementele sistemului reticuloendotelial se caracterizează prin *mobilitate, sensibilitate chimică* (chimotactism), *funcţiune pexică* şi *digestie intraprotoplasmatică.*

Dotat cu aceste proprietăţi, sistemul reticuloendotelial îndeplineşte trei funcţiuni esenţiale şi anume: *plastice, defensive* şi *trofice.* Integritatea sa anatomică şi fiziologică influenţează capacitatea defensivă a unui organism. Dacă este important, pentru a putea preciza evoluţia unei stări morbide, să ştim cum funcţionează ficatul, cordul, rinichii etc., tot atît de important este să cunoaştem modul de funcţionare a sistemului reticuloendotelial. Cum se poate explora capacitatea funcţională a sistemului reticuloendotelial?

Unele din metodele de explorare sînt bine cunoscute. Numărul elementelor albe din sînge dă, de exemplu, indicaţii privind capacitatea defensivă a unui organism. Leucopeniile denotă deficienţe grave ale sistemului defensiv, leucocitoza, dimpotrivă, indică o putere de apărare mărită. Leucopenii se observă în diverse infecţii ca: febra tifoidă, pesta porcină, malarie, sifilis etc. Unele substanţe ca vaporii de benzen, piramidonul, razele X şi gama, sulfamidele pot produce leucopenii. În unele infecţii creşte numărul polinuclearelor, iar în altele (tuberculoză, bruceloză, cancer) numărul monocitelor.

Capacitatea de absorbţie a unor soluţii colorante, cum este în special roşul de Congo, dă, la fel, măsura capacităţii pexice a sistemului reticuloendotelial. La omul normal, 1 oră după injectarea colorantului în sînge 2/3 din cantitatea injectată este absorbită şi nu se găseşte în sîngele circulant, în timp ce la un bolnav cantitatea fixată este mult mai mică şi cu cît este mai mică cu atît sistemul reticuloendotelial se află într-o mai mare deficienţă.

Determinarea indicelui opsonic al serului sanguin dă, la fel, indicaţii cu privire la integritatea sistemului reticuloendotelial, la capacitatea de a produce opsonine normale. K a v e ţ k i, tot în vederea explorării sistemului reticuloendotelial, determină coeficientul cancerolitic al unui ser sanguin. În acest scop, serul este amestecat cu o suspensie de celule canceroase, provenind dela şoarece sau şobolan. Se face numărătoarea celulelor imediat şi după 1 oră la 37°C. Procentul celulelor lizate în interval de 1 oră este raportat la procentul celulelor canceroase lizate, în aceleaşi condiţii, însă în afara prezenţei serului. Cînd raportul este egal cu 1 şi nu depăşeşte 1,6, coeficientul cancerolitic este redus; dimpotrivă, o cifră superioară lui 1,6, mergînd pînă la 3, denotă că sistemul reticuloendotelial are o capacitate cancerolitică normală.

L e s c i n s k i preconizează următorul procedeu pentru a determina integritatea sistemului reticuloendotelial. El injectează, intradermic, 0,25 ml dintr-o soluţie 0.2—0,5% de albastru de tripan. Măsoară diametrul petei

constituite imediat şi după 24 de ore. Cu cît raportul între cele două cifre este mai mare — 10 sau mai mult — cu atît viteza de difuziune a colorantului de-a lungul fibrelor colagene este mai accentuată şi deci sistemul reticuloendotelial mai sănătos, cu o capacitate de reacţie mai importantă. Cifre mai mici ca 10 indică un prognostic grav.

Focarul inflamator şi rolul său defensiv. Traversarea pielii sau mucoaselor de către un agent iritativ, animat sau neanimat, produce, la locul de pătrundere, o reacţie cunoscută sub numele de focar inflamator. Reacţia locală are, de cele mai multe ori, funcţiuni defensive. P a v l o v s k i a făcut, în acest sens, o observaţie interesantă, încă din 1892. El a constatat că inoculînd, în articulaţia unui animal, o cultură de stafilococi, aceştia trec de aici în sînge. În condiţii similare diseminarea este oprită, dacă în articulaţie se provoacă, în prealabil, o reacţie inflamatorie prin intermediul esenţei de terebentină. A B o q u e t şi N. S t a m a t i n fac, în 1939, un studiu amănunţit asupra rolului focarului inflamator în apărarea organismului faţă de bacilii cărbunelui. Autorii constată că în edemul inflamator, provocat, în ţesutul conjunctiv subcutanat de la iepure, prin injectarea toxinei stafilococice, saponinei etc. se pot inocula, fără nici un pericol, 100, 1 000 sau chiar 1 milion de doze minime mortale de bacili ai cărbunelui virulenţi. Capacitatea defensivă a focarului inflamator este, în acest caz, evidentă şi enormă. Este drept însă că nu toate bacteriile sînt inhibate, în aceeaşi măsură, de elementele prezente în focarul inflamator.

Constituirea focarului inflamator este rezultatul unei serii de acţiuni şi reacţii organice care se înlănţuie şi se condiţionează. O dată constituit procesul inflamator se caracterizează prin cinci simptome cardinale recunoscute ca atare încă din antichitate şi anume: roşeaţă, căldură, tumefierea regiunii, tulburări funcţionale şi durere (*rubor, calor, tumor, functio laesa* et *dolor*).

Mecanismul formării focarului inflamator a fost cercetat, încă din 1867, de C o h n h e i m, care foloseşte în acest scop peritoneul de broască pe care îl scoate din cavitatea peritoneală o dată cu intestinul şi-l aşază la microscop fără a-l detaşa de animal. Organul îşi păstrează, astfel, toate relaţiile cu organismul. Foiţa peritoneală fiind transparentă, se pot observa, în intimitatea ei, circulaţia sîngelui în vase. In prezenţa unui factor iritativ, peritoneul reacţionează şi C o h n h e i m are posibilitatea, folosind această tehnică, să urmărească, la microscop, constituirea unui proces inflamator. In formarea acestui proces, autorul distinge patru faze şi anume:

1. dilatarea vaselor sanguine, vene şi mai ales artere, constituie prima fază, primul răspuns al ţesutului în prezenţa factorului iritant, ceea ce clinic se traduce prin eritemul (înroşirea) regiunii;

2. încetinirea circulaţiei sanguine apare în faza a doua şi ea este o consecinţă a dilataţiei vaselor;

3. încetinirea circulaţiei, la rîndul ei, duce la apariţia elementelor albe în lumenul vaselor şi lipirea lor de faţa internă a vaselor sanguine, constituind ca un manşon (fenomenul de marginaţie);

4. globulele albe traversează peretele vascular: apar întîi nişte umflături ale peretelui vascular extern care nu sînt altceva decît pseudopodele leucocitelor; apoi celulele în întregime ies din vas şi înoată în lichidul din jurul vasului.

Scanned with OKEN Scanner

Cohnheim a pus în evidenţă, prin tehnica sa, aspectele morfologice ale inflamaţiei, dar mecanismul fiziologic al producerii modificărilor notate în cele patru puncte rămînea încă de precizat. De ce şi cum o substanţă iritantă produce dilataţia vaselor, de ce globulele albe se marginează şi ies din vase etc. în fine, o serie de aspecte fiziopatologice trebuiau încă lămurite pentru a avea o înţelegere clară a fenomenului.

Fără a putea epuiza acest capitol, vom analiza cîteva aspecte care se referă, pe de o parte, la mecanismul prin care microbii provoacă un focar inflamator, provoacă diapedeza (*dia* = peste; *pedao* = sar) şi afluxul leucocitar, iar, pe de altă parte, mecanismul prin care germenii patogeni se pot sustrage actului de fagocitoză. Vom privi, deci, problema focarului inflamator şi a fagocitozei de pe poziţiile microbiologiei.

FAGOCITOZA ŞI FAZELE EI

În actul fagocitozei se disting trei faze şi anume: 1) apropierea leucocitelor de materia fagocitabilă; 2) înglobarea materiei fagocitabile şi 3) digestia materiei fagocitate. Să examinăm aceste diverse faze, ţinînd seama de factorii care le condiţionează, favorizîndu-le sau inhibîndu-le realizarea.

Faza de apropiere a leucocitelor de materia fagocitabilă. Fagocitoza nu constituie o particularitate a leucocitelor animale; fenomenul se întîlneşte la o serie întreagă de fiinţe monocelulare, el constituind modul lor normal de nutriţie. Leucocitele, înglobînd celulele moarte sau resturile de celule, se nutresc, dar, în acelaşi timp, ele curăţă umorile de elemente inutile şi chiar jenante pentru organism. Fagocitoza globulelor roşii deteriorate permite recuperarea fierului de către organism; ingestia germenilor la porţile de intrare constituie un factor principal în apărarea organismului faţă de tendinţele de invazie ale microorganismelor. După declararea unei infecţii, leucocitele îşi continuă activitatea lor. Ele au fost, în acest caz, învinse la porţile de intrare, dar pot fi învingătoare în organism cînd acţiunii lor se pot adăuga alţi factori defensivi de natură umorală. O colaborare perfectă este astfel stabilită între organism şi leucocite.

Leucocitele au însuşiri potrivite activităţii lor. Fiind nevoite să prindă particulele alimentare, ele trebuie să fie mobile. Datorită mobilităţii şi elasticităţii cu care sînt dotate, ele pot traversa pereţii capilarelor sanguine. Mobilitatea acestor celule se poate uşor observa şi la microscop. În acest scop, o picătură de lichid peritoneal, de la un animal injectat, în prealabil, cu o substanţă iritantă, se amestecă cu puţină apă fiziologică şi apoi se examinează la microscop, la o temperatură apropiată cu aceea a corpului animal de la care provin. În aceste condiţii se observă că leucocitele au o mobilitate. Această mobilitate se accentuează cînd se adaugă însă o materie fagocitabilă. Protoplasma leucocitară prezintă, în acest caz, o mobilitate foarte vie, ea agitîndu-se, în jurul nucleului, ca o rochie prea largă în jurul unui corp. Leucocitele simt deci prezenţa unei materii nutritive pentru ele şi, mai mult încă, sînt atrase către materia fagocitabilă. Această atracţie provoacă deplasarea lor. Atracţia şi deplasarea se poate uşor pune în evidenţă. Astfel, o injecţie intraperitoneală de bulion provoacă un aflux important de elemente albe. Bulionul exercită deci o funcţiune de apel faţă de aceste elemente. Migrarea masivă a leucocitelor din capilare în cavita-

Scanned with OKEN Scanner

tea peritoneală este înlesnită de structura pereților acestor cavități și în special de bogăția lor în capilare. Intr-adevăr, același lichid, injectat pe cale subcutanată, deci într-un țesut mai puțin vascularizat, nu provoacă decît un aflux mediocru de leucocite, iar, pe cale intradermică, țesut încă și mai puțin vascularizat, puterea de apel a bulionului este și mai redusă. Aceste diferențe în modalitățile de reacție a aparatului leucocitar, în raport cu diversele țesuturi, atrag după ele diferențe de sensibilitate ale diverselor țesuturi organice față de unele bacterii. Astfel, o infecție cărbunoasă se face, așa cum s-a spus deja, cu o doză mult mai mare de germeni pe cale intraperitoneală decît pe cale subcutanată și mai ales intradermică.

Cercetările, făcute in vitro ca și in vivo, au arătat, în mod neîndoielnic, că leucocitele sînt atrase de anumite substanțe. Atracția comandă de altfel toate manifestările vitale, nutriție, reproducție etc., la viețuitoarele inferioare. S-au determinat, în unele cazuri, natura substanțelor răspunzătoare de procesul atracției. Astfel, atracția spermatozoizilor de ferigă se realizează de către acidul malic secretat de organismele femele. Principiile chimice, exercitînd o atracție pentru leucocite, au fost izolate atît din țesuturi cît și din corpul bacteriilor. Țesuturile lezate pun în libertate substanțe cu funcțiuni de apel pentru leucocite. Așa se explică adunarea leucocitelor din organism în jurul unor corpi inerți sau țesuturi moarte. Prima observație, în acest sens, a fost făcută de Mecinikov. Acest savant, introducînd o bucățică de lemn sau chiar un bastonaș de sticlă, în clopotul gelatinos al unei meduze, observă, după cîteva ore, un nor de leucocite în jurul corpului introdus. Sticla, ca și lemnul, fiind insolubile, nu au putut chema leucocitele, dar țesuturile lezate au putut face acest lucru. Menkin V. reușește, mai tîrziu (1939), să izoleze din țesuturi o polipeptidă, pe care o numește leucotaxină și care exercită, în condiții experimentale, o atracție pentru leucocite, atît in vivo cît și in vitro. Substanța se găsește în lichidul inflamator și ea ar rezulta din dezintegrarea proteinelor din țesuturile al căror metabolism este tulburat de prezența substanței iritante.

In afară de polipeptide și alte substanțe chimice ca amidonul, glicogenul și inulina pot exercita funcțiuni de apel față de leucocite. Bacteriile și produsele lor sînt însă, din acest punct de vedere, cele mai active. Observații deja vechi pun în evidență această însușire. Iată în acest sens o experiență edificatoare. Se introduc, sub piele la broască, două capilare: unul din ele conține bulionul simplu, iar al doilea, același bulion în care se dezvoltase o cultură bacteriană. După cîteva ore, examinînd cele două capilare, se constată formarea unui dop de leucocite la capătul capilarului care conține cultura bacteriană, în timp ce capilarul care conține numai bulion nu prezintă o asemenea formație. Reiese din această experiență că secrețiile bacteriene au impresionat leucocitele și acestea s-au concentrat în jurul focarului cu cea mai mare putere de atracție. Această mișcare de orientare a leucocitelor se poate pune în evidență și in vitro. Amestecînd, pe o lamă, suspensii de leucocite și granule de amidon sau de alte substanțe cu proprietăți chimiotactice pozitive se observă, după 1 oră, la 37°C, în jurul granulei de amidon, o coroană de leucocite. Indreptarea leucocitelor spre substanța fagocitabilă se face, în condiții optime, în prezența alexinei. S-a demonstrat că alexina activează mobilitatea leucocitelor și că în prezența ei procesul respirator al acestor celule este mult mai activ ca în lichidele care nu o conțin. Serul sanguin încălzit, deci fără alexină, este un slab

activator al mobilității leucocitelor, el comportîndu-se aproape ca apa fiziologică.

Mobilitatea leucocitelor este activată de ionii de calciu ; absența acestor elemente, dimpotrivă, o inhibează.

Natura substanțelor bacteriene care atrag leucocitele a putut fi precizată la unele specii. Principiul activ secretat de stafilococii toxigeni este, de exemplu, un polipeptid. Stafilococii netoxigeni conțin însă un polizaharid specific acestor germeni și care, injectat la animale, provoacă de asemenea un aflux leucocitar. Substanțele de natură hidrocarbonată, izolate de la bacteriile Gram negative, ar avea același efect. Antigenul complet, izolat de Boivin și Mesrobeanu din soma bacteriilor intestinale, este activ față de leucocite în doze moderate ; dozele mari împiedică însă afluxul leucocitar, chiar dacă antigenul este injectat în amestec cu un produs activ față de leucocite. Activitatea de respingere (tactismul negativ) exercitată de această substanță pare, deci, foarte puternică. Se constată, în acest sens, că injectînd separat, la același animal, antigenul glucidolipidic și un produs activ, nu se constată un aflux leucocitar nici la locul de injecție a produsului activ. Antigenul glucidolipidic a paralizat mișcările de orientare a leucocitelor, inhibînd, în special, diapedeza. Mecanismul inhibiției nu este încă lămurit. Se admite, ipotetic, că această inhibare s-ar face prin intermediul adrenalinei, a cărei secreție este exagerată de endotoxina bacteriană. Ca o consecință a hipersecreției adrenalinice se produce vasoconstricția și inhibarea diapedezei. Această abolire a sensibilității leucocitare se observă și în cazurile grave de febră tifoidă la om ; într-adevăr, injecții cu esență de terebentină — substanță care exercită un puternic tactism pozitiv — rămîn, în asemenea cazuri, fără rezultat. Acest fapt se observă și în infecțiile grave ale animalelor, în formele grave de jigodie a cîinilor, de exemplu.

Fracțiunea glucidică a antigenului complet atrage leucocitele și ei i se datorește afluxul leucocitelor în cazul injecțiilor cu doze moderate de antigen complet. Dar antigenul complet conține și fracțiuni toxice pentru leucocite, fracțiunile lipidice și polipeptidice, care împiedică, în doze importante, tactismul pozitiv al fracțiunii glucidice. Fracțiunea toxică a antigenului complet poate fi neutralizată de către anticorpii respectivi. Într-adevăr, cobaii pot fi imunizați față de efectul nociv al acestei endotoxine prin injecții repetate cu acest produs. La aceste animale, la locul de injecție a endotoxinei se formează repede un edem inflamator în care leucocitele abundă, ceea ce înseamnă că fracțiunea leucotoxică a endotoxinei a fost neutralizată. Numai în aceste condiții, într-adevăr, leucocitele se pot aglomera la locul injecției.

In afară de endotoxinele bacteriilor Gram negative, alte fracțiuni extrase din corpul bacteriilor ar influența migrația leucocitelor. Din culturi de *Proteus vulgaris* sau de *Bacillus pyocyaneus,* de exemplu, se izolează două fracțiuni : una este o nucleoproteidă și alta o substanță glucido-lipidică. Ambele substanțe atrag leucocitele. Fracțiunea glucido-lipidică este mult mai activă ca nucleoproteida. Substanțe cu tactism pozitiv s-au găsit și la bacilul tuberculozei și anume s-a identificat un polizaharid și o nucleoproteidă ; prima este mai activă ca cea din urmă. Bacteriile Gram pozitive atrag leucocitele prin substanțele glucidice pe care le conțin, care sînt situate la suprafața celulei și se dizolvă în mediu chiar cînd celula este vie.

Scanned with OKEN Scanner

Serurile antileucocitare, obținute prin injectarea intravenoasă a leucocitelor unei specii — cobai — la altă specie — iepure — aglutinează leucocitele, inhibă fagocitoza și orientarea leucocitelor, atît in vivo cît și in vitro, în diluții de 1/20.

Faza de înglobare a materiei fagocitabile. Înglobarea particulelor fagocitabile de către leucocite se poate urmări atît in vivo cît și in vitro. Pentru a urmări fagocitoza, in vivo, se folosesc, în general, marile cavități seroase, cavitatea peritoneală sau pleurală a cobaiului sau iepurelui. Se injectează, în acest scop, în una din aceste cavități, 3 — 5 — 10 ml de bulion și, cîteva ore mai tîrziu, atunci cînd afluxul leucocitar este suficient de abundent, se inoculează o suspensie de germeni saprofiți sau puțin virulenți și apoi se extrage, din timp în timp, lichidul peritoneal care se examinează la microscop în picătură suspendată sau în frotiuri colorate. Chiar după $^1/_2$ de oră de la inocularea suspensiei bacteriene, se pot întîlni figuri de fagocitoză. In protoplasma unui singur leucocit se pot găsi unul sau mai mulți microbi. Numărul germenilor liberi în lichid scade de la un examen la altul și, în cîteva ore, ei pot să dispară cu desăvîrșire. In vitro, fenomenul are o evoluție mai lentă, dar rezultatele sînt aceleași. Leucocitele, în acest caz, se recoltează din cavitatea peritoneală a unui cobai injectat, în prealabil, cu bulion. Leucocitele plutesc într-un lichid vîscos de care se separă prin centrifugare. Pentru a înlesni separația lor, lichidul vîscos, recoltat din peritoneu, se amestecă, înainte de centrifugare, cu puțină apă fiziologică. O dată cu acest lichid, se elimină și eventualele substanțe dizolvate în el și care ar putea influența fagocitoza. Sedimentul leucocitar, rezultat prin centrifugare, se ia cu apă fiziologică și se amestecă apoi cu o suspensie de germeni fagocitabili. Amestecul se pune la termostat la 37°C și se examinează microscopic, din timp în timp.

Înglobarea apare ca un fenomen simplu atunci cînd particulele fagocitabile nu se opun acestei acțiuni. Dacă germenii saprofiți nu fac nici un fel de opoziție leucocitelor care îi înglobează, cei patogeni, în schimb, dispun de mijloace care pot împiedica înglobarea. Aceste mijloace variază în general de la o specie bacteriană la alta. Astfel, unii germeni patogeni secretă substanțe care paralizează leucocitele — principiul antifagocitar secretat de pneumococi — alții pun în libertate toxine care le distrug, le dezintegrează — leucocidinele secretate de stafilococi, streptococi etc. — alții, în fine, suferă, in vivo, modificări de ordin morfologic care îi fac nefagocitabili — încapsularea bacilului cărbunelui, a streptococului etc.

Bacilii cărbunelui capsulați nu sînt într-adevăr niciodată întîlniți în protoplasma leucocitară. Natura opoziției exercitată de capsulă pare a fi de natură fizico-chimică. O condiție a fagocitozei o constituie, într-adevăr, adeziunea materiei fagocitabile de protoplasma leucocitară. Se pare că o asemenea adeziune nu se poate face între capsulă și protoplasma leucocitară din cauza însușirilor fizico-chimice ale capsulei. Bacilii capsulați morți se comportă ca și cei vii, ceea ce ne arată că opoziția exercitată de capsulă nu este în legătură cu virulența bacteridiei.

Adeziunea materiei fagocitabile la protoplasma leucocitară este un factor esențial al fagocitozei. Speciile bacteriene patogene nu aderă, în general, de leucocite, însă anumiți factori umorali pot să le mărească capacitatea lor adezivă. S-a observat, în acest sens, că într-un amestec de leucocite și streptococi, fagocitoza devine mult mai activă dacă adăugăm amestecului puțin ser antistreptococic. Alte specii bacteriene devin și ele mai

Scanned with OKEN Scanner

ușor fagocitabile în prezența serului care conține anticorpi opsonizanți. În afară de opsonine, care se găsesc în serul normal, dar, într-o mai mare cantitate, în serul imun, mai sînt și alți factori care pot înlesni fagocitoza. Astfel, diastaze leucocitare pot transforma o suspensie de germeni nefagocitabili, în fagocitabili.

Faza de digestie a materiei înglobate. Germenii, înglobați în protoplasma fagocitelor, suferă modificări importante atît în ceea ce privește forma lor cît și afinitățile lor tinctoriale. Astfel, ei devin globuloși chiar dacă forma lor inițială era de bastonaș sau de spiril. Cocii își păstrează forma însă își măresc dimensiunile. Afinitatea celulei bacteriene pentru culorile bazice tinde să dispară, fiind înlocuită cu o însemnată capacitate de fixare a culorilor acide.

Este pe deplin demonstrat că dispariția particulelor înglobate de fagocite se datorește unor fenomene de digestie. În acest sens, s-au pus în evidență, în protoplasma fagocitelor diferiți fermenți. S-a constatat de exemplu că o picătură de extras leucocitar uman sau canin, depusă pe suprafața serului coagulat, provoacă formarea, în dreptul picăturii, a unei depresiuni care nu poate fi datorită decît digestiei serului. Puroiul, datorită prezenței leucocitelor și fermenților puși în libertate prin distrugerea lor, are proprietăți proteolitice. El lichefiază gelatina, fibrina, caseina, albumina coagulată etc.

Între diversele celule cu însușiri fagocitare se constată diferențe în modul de comportare față de serul coagulat. Astfel, polinuclearele topesc serul coagulat, în timp ce mononuclearele sînt inactive, deoarece numai polinuclearele au fermenți proteolitici activi în mediul alcalin al serului. Protezele mononuclearelor sînt active în mediu acid.

Fermenții proteolitici asemănători celor ce se extrag din polinucleare se găsesc în măduva osoasă, locul de formare a acestor elemente. Splina și ganglionii limfatici conțin proteaze active în mediul acid, deci asemănătoare celor ce se găsesc în mononucleare.

Fermenții proteolitici leucocitari sînt endoglobulari ; ei nu se pun în libertate decît prin distrugerea leucocitelor. Acțiunea lor este împiedicată de serul animalului de la care provin, deoarece acesta conține antifermentul respectiv. Acest antiferment este distrus de cloroform. Se constată, într-adevăr, că cheagul sanguin căruia i se adaugă cloroform poate fi lichefiat de fermenții propriilor leucocite. Antifermentul fiind distrus, fermenții proteolitici, puși în libertate de leucocite, pot să dezvolte, în aceste condiții, activitatea lor specifică.

Pe lîngă fermenți proteolitici, s-au pus în evidență, în protoplasma leucocitelor, fermenți capabili să atace grăsimile (lipaze), precum și fermenți oxidanți (oxidaze).

Prezența acestor fermenți explică, într-o mare măsură, activitatea antibacteriană a leucocitelor. Cercetările făcute cu scopul de a lămuri originea principiilor bactericizi din umori au dovedit că extrasele leucocitare posedă o puternică activitate litică față de un număr important de specii bacteriene. Am văzut mai sus că în cavitatea peritoneală a iepurilor imunizați contra streptococului iau naștere, prin distrugerea leucocitelor, substanțe care omoară streptococii capsulați făcîndu-i astfel, fagocitabili. Petterson obține, prin macerarea leucocitelor, spălate și triturate, la tempera-

tura de 37°C, un extras numit de autor endolizină. Extrasul este bactericid pentru o serie întreagă de bacterii. Prin macerarea aceloraşi elemente, timp de 18 ore, într-o soluţie n/100 de acid clorhidric, se obţine un extras capabil să transforme, ca şi serul imun proaspăt, o suspensie de vibrioni ai holerei în granule. Acest extras este activ şi faţă de alte bacterii cum sînt streptococii, bacilii difteriei etc., care rezistă faţă de bacteriolizinele din umori. Principii litici izolaţi din leucocite nu se pot confunda însă cu alexina: într-adevăr, substanţele active conţinute de extrasul leucocitar nu se distrug la 60°C, sînt în aceeaşi măsură de activi faţă de germenii sensibilizaţi sau nu prin anticorpi şi nu hemolizează globulele roşii sensibilizate sau normale.

Dotate cu asemenea însuşiri, leucocitele reprezintă pentru organism un factor de apărare de prim ordin. Apărat de factorii multipli, unii umorali, alţii celulari, organismul respinge cea mai mare parte din germenii atacatori. Unii germeni reuşesc însă să pătrundă în organism şi să-şi dezvolte acţiunea lor patogenă, deoarece ei se apără cu succes atît faţă de principii bactericizi din umori, cît şi faţă de fagocite. Pe acestea din urmă, unii germeni patogeni le împiedică să se apropie, alţi germeni nu se pot opune apropierii leucocitelor, dar se opun înglobării lor şi alţii, în fine, chiar înglobaţi nu pot fi distruşi de fermenţi intraprotoplasmatici. În interiorul protoplasmei leucocitare, aceşti din urmă germeni nu numai că rezistă, dar se pot chiar multiplica. În puroiul gonococic, se observă că marea majoritate a germenilor sînt înglobaţi de către leucocite, dar, cu toate acestea, infecţia nu este jugulată, leucocitele umane nereuşind să digere bacteriile.

Bacilii tuberculozei prezintă aceeaşi rezistenţă faţă de fermenţii leucocitari. Inoculaţi pe cale intravenoasă, ei sînt înglobaţi de polinucleare la nivelul pulmonului, dar se menţin vii în interiorul protoplasmei. Anumite secreţii bacteriene pot chiar să distrugă fagocitul, bacilii, punîndu-se astfel în libertate. Mononuclearele şi macrofagele, care joacă un rol important în formarea tuberculului, pot fi şi ele distruse de produşii necrozanţi secretaţi de bacilul tuberculozei.

În concluzie, organismul animal dispune, în condiţii fiziologice, de un sistem defensiv antibacterian destul de complet şi vigilent. Unele specii bacteriene pot însă înfrînge acest sistem şi dezvolta procese patologice.

Scanned with OKEN Scanner

DOBÎNDIREA UNOR FACTORI DE IMUNITATE

Un organism se naşte cu o structură morfologică, cu o serie de elemente umorale sau celulare care îi permit să se opună tendinţelor invazioniste ale microbilor, tendinţe care există şi se exercită în tot timpul vieţii unui organism. Dovada existenţei acestor tendinţe de invazie o găsim în constatarea că îndată după moarte şi, uneori, chiar în faza agonică, macroorganismele sînt invadate de bacterii. Această constatare ne obligă să conchidem că dacă în timpul vieţii organismele animale şi chiar şi cele vegetale îşi menţin sterilitatea, acest lucru se datoreşte unor mijloace de apărare antimicrobiană pe care ele le-au moştenit de la părinţi ca un caracter de specie. Aceste mijloace normale, apanajul speciei din care un individ face parte şi pe care le-am examinat în capitolul precedent, se pot îmbogăţi în cursul existenţei individului ; la mijloacele pe care specia le-a cîştigat în lupta dusă cu microbii în cursul filogenezei se adaugă noi mijloace, individuale, legate de condiţiile de mediu în care se dezvoltă şi trăieşte un individ. Se admite, din cauză că timpul în care s-au urmărit aceste procese este scurt, că asemenea mijloace dispar o dată cu individul. O înregistrare a lor în plasma germinativă a speciei se face însă în cursul fiecărei generaţii, conform principiilor geneticii miciuriniste, dar această înregistrare devine manifestă şi sezisabilă numai atunci cînd o serie de generaţii au suferit influenţa aceluiaşi factor morbigen. Citǎm, în acest sens, observaţia că, în general, animalele şi oamenii care trăiesc într-o regiune în care o anumită boală este de mult timp enzootică se nasc cu un grad de rezistenţă faţă de boala respectivă mai mare ca animalele sau oamenii din afara regiunii. Asistăm, în aceste cazuri, la o înregistrare, în plasma germinativă, a acţiunii unui factor de mediu — microbul patogen. O modificare somatică devine, în acest caz, ereditară, ceea ce apare ca foarte logic, căci ereditatea, după L î s e n k o, este rezultatul concentrării influenţelor condiţiilor mediului extern, asimilate de organism, într-o serie de generaţii.

Constatarea că mijloacele normale de apărare cu care un individ se naşte se pot amplifica în cursul existenţei sale este confirmată de vechi şi numeroase observaţii. Un copil, de exemplu, se naşte fără o rezistenţă apreciabilă faţă de virusul pojarului şi cînd vine în contact cu virusul se îm-

Scanned with OKEN Scanner

bolnăveşte. Trecut prin boală, el devine însă rezistent faţă de virusul respectiv. Infecţia, contactul cu virusul, duc la crearea în organism a unor mijloace care se opun invaziei virusului. Organismul a dobîndit o funcţiune nouă, funcţiunea de a se apăra faţă de virusul pojarului. Aceasta este o funcţiune individuală, căci ea nu se găseşte la copiii care nu au fost bolnavi de pojar. Organismul unui copil trecut prin pojar şi-a mărit spectrul de activitate antimicrobiană ; iniţial el se opunea invaziei unei serii întregi de microbi ; după trecerea prin boală, la seria iniţială se mai adaugă încă un microb şi anume virusul pojarului.

In acest exemplu, amplificarea mijloacelor de apărare antimicrobiană s-a făcut în condiţii naturale. Asemenea amplificări se pot obţine însă şi pe cale artificială, prin intervenţia medicului, ceea ce este, de altfel, mult mai recomandabil. Imunizarea pe cale naturală este, într-adevăr, în unele cazuri, plină de primejdii pentru individ, din cauză că ea se face la întîmplare şi cu microbi de patogenitate plină. In condiţii artificiale, medicina obţine însă amplificări similare celor obţinute pe cale naturală, folosind însă produse (vaccinuri, seruri) care nu mai pun în pericol viaţa individului.

CLASIFICAREA STĂRILOR DE IMUNITATE

După ce am văzut factorii normali de apărare antimicrobiană şi am arătat că organismul îşi poate amplifica şi completa mijloacele defensive normale, să vedem cum se clasifică stările de imunitate, ţinînd seama de toţi factorii care condiţionează aceste stări.

Stările de imunitate se împart în două grupe şi anume :

1. stări de imunitate naturală,
2. stări de imunitate dobîndită.

La rîndul lor stările de imunitate dobîndită se împart în :

a) active,
b) pasive.

Stările de imunitate activă pot fi :

— sterile,
— nesterile sau stări premunitive.

Imunitatea activă se poate dobîndi pe căi naturale, adică prin infecţie naturală sau pe cale artificială, adică prin intervenţia omului. La fel, imunitatea pasivă se poate instala pe căi naturale sau artificiale.

IMUNITATEA NATURALĂ

Se înţelege prin imunitate naturală o stare de nereceptivitate datorită caracterelor morfo-fiziologice ale speciei căreia îi aparţine organismul. Rezistenţa găinii faţă de bacilii cărbunelui este o stare de imunitate naturală şi ea există la toţi indivizii care constituie specia găină.

MECANISMELE IMUNITĂŢII NATURALE

Rezistenţe naturale se întîlnesc la toate speciile : astfel, toate speciile animale, cu excepţia omului, au, de exemplu, o imunitate naturală faţă de gonococ ; toate speciile animale, cu excepţia porcului, au o imunitate faţă

de virusul pestei porcine etc. Care este mecanismul acestor stări de imunitate ?

Multiplele stări de rezistenţă naturală care se întîlnesc în lumea animală şi vegetală recunosc mecanisme variate. În această variaţie există însă trei mecanisme pe care le putem considera principale.

1. Există stări de imunitate naturală care sînt datorite structurii tegumentelor animalelor respective, structură ce reprezintă adaptări morfo-fiziologice obţinute de specia respectivă în cursul evoluţiei. Cobaiul nu se infectează, de exemplu, cu bacilii tuberculozei sau cărbunelui, pentru că aceşti germeni nu pot pătrunde, în condiţii naturale, în intimitatea ţesuturilor. De îndată ce, în condiţii experimentale, se introduc doar cîţiva bacili în ţesuturi, animalul se infectează şi moare.

2. Există stări de imunitate naturală care sînt datorite unei lipse de reactivitate din partea organismului. Pentru ca o infecţie să apară este necesară intervenţia unui proces de interacţiune între macro- şi microorganism, este necesară o reacţie a organismului faţă de acţiunea agresivă a germenului.

În lipsa acestei reacţii organice infecţia nu apare, aşa cum se constată şi cum am arătat deja la studiul infecţiei. Animalele în hibernare sau în stare de somn nu se infectează cu anumiţi germeni, care însă produc infecţia la animale treze, animale cu o excitabilitate normală. Păsările tuberculoase şi caşectice au un grad însemnat de rezistenţă faţă de pasteurele. La fel, mamiferele caşectice nu se îmbolnăvesc de antrax. Exemplele date constituie, în terminologia lui Zdrodovski, cazuri de pierdere temporară a excitabilităţii sau fenomene de imunitate areactivă cîştigată sau rezistenţă nespecifică temporară şi nu sînt stări de imunitate naturală adevărată. Există însă cazuri congenitale de lipsă de reactivitate faţă de excitantul infecţios, ceea ce constituie fenomene de imunitate naturală, în sensul definiţiei date mai sus. Rezistenţa găinii faţă de bacilii cărbunelui pare a fi un caz de areactivitate congenitală. Găina nu se îmbolnăveşte de antrax fiindcă este indiferentă faţă de acest agent, pentru că nu reacţionează faţă de el.

3. Există, în fine, stări de imunitate naturală care sînt datorite acţiunii unor factori normali de apărare — factori humorali sau celulari. Aceşti factori intervin şi distrug germenii sau toxinele care, traversînd pielea sau mucoasele, s-au infiltrat în ţesuturi. Astfel, imunitatea bovideelor faţă de intoxicaţia tetanică pare a fi datorită capacităţii antitoxice a serului sanguin al acestor animale.

IMUNITATEA DOBÎNDITĂ

Imunitatea dobîndită este o stare de nereceptivitate pe care o prezintă unii indivizi aparţinînd unei specii sensibile faţă de germenul considerat. Unii indivizi ai speciei umane, de exemplu, sînt rezistenţi faţă de virusul pojarului ; la fel, unii indivizi ai speciei porc sînt imuni faţă de virusul pestei. Exemplele se pot multiplica la infinit.

În opoziţie cu imunitatea naturală, imunitatea dobîndită nu este un caracter de specie, ci unul individual ; în timp ce prima stare a fost obţinută de specie în cursul dezvoltării ei, imunitatea dobîndită este realizată de un individ printr-o experienţă şi luptă personală.

Scanned with OKEN Scanner

ORIGINEA IMUNITĂȚII DOBÎNDITE

Un organism, aparținînd unei specii sensibile față de o specie microbiană, poate deveni rezistent față de specia microbiană considerată în două moduri:

1. Prin contactul personal și propriu cu microbul patogen sau cu produsele sale de secreție. Imunitatea astfel dobîndită se numește *activă,* pentru că ea rezultă dintr-un conflict activ pe care macroorganismul sensibil l-a avut cu microorganismul patogen. Conflictul dintre cei doi antagoniști se poate sfîrși cu distrugerea și dispariția din macroorganism a microorganismului și atunci imunitatea se numește *sterilă,* sau, dimpotrivă, microorganismul, după evoluția infecției, persistă în organism și imunitatea se numește *nesterilă* sau stare de *preimunitate.*

2. Primind unele substanțe antiinfecțioase specifice care au fost fabricate de alt organism în cursul unui conflict cu microorganismul patogen. Pentru a înțelege mai bine acest fel de imunitate să luăm un exemplu. O oaie care a fost bolnavă de variolă și s-a vindecat are față de virusul variolei o imunitate activă, pentru că această imunitate s-a născut din conflictul organismului oii cu microbul patogen. În serul sanguin al acestei oi se găsesc însă substanțe antiinfecțioase, și anume, în cazul de față, antivariolice și inoculînd serul ei sanguin la o oaie receptivă, aceasta va deveni și ea imună, deoarece ea a primit substanțele antivariolice existente în organismul unei alte oi. Imunitatea obținută de un organism prin serul sanguin are, în raport cu aceea a primului organism, o altă origine. Ea nu s-a născut din conflictul cu microorganismul, nu este deci activă, ci animalul a primit produșii antiinfecțioși fabricați de alt organism și de aceea această imunitate se numește *pasivă.* Organismul în stare de imunitate pasivă este deci beneficiarul luptei dîrze pe care un alt organism a dus-o cu un microb patogen. Imunitatea pasivă poate fi instituită pe căi artificiale, prin intervenția medicului, adică prin injectarea unui ser care conține substanțe antiinfecțioase, dar ea se poate instala și pe căi naturale și anume prin transmiterea substanțelor antiinfecțioase de la mamă la făt și acest fel de imunitate se mai numește și *ereditară.*

Imunitatea ereditară este un caz particular de imunitate pasivă. Într-adevăr, și într-un caz și în altul, beneficiarul primește principii antimicrobieni sau antitoxici fabricați de un alt organism; în cazul imunității pasive acești principii sînt introduși printr-un ser imun, în timp ce în imunitatea ereditară ei se transmit de la mamă la făt, fie prin filtrul placentar (imunitate diaplacentară), fie prin lapte (imunitate trofogenă).

CONDIȚIILE TRANSMITERII IMUNITĂȚII DE LA MAMĂ LA FĂT

Problema transmiterii principiilor antiinfecțioși de la mamă la făt, deși a fost cercetată, nu a primit încă o soluție definitivă. Unii cercetători admit posibilitatea transmiterii acestor principii prin filtrul placentar, alții o neagă. În orice caz, transmiterea nu se face cu regularitate și este legată de caracterele speciei, în special de structura placentei. H a r m s (1942) împarte, din acest punct de vedere, mamiferele în trei grupe. În prima grupă intră calul, boul, porcul, capra, oaia, măgarul, cămila, tapirul, animale care au o placentă sindesmocorială compusă din șapte straturi și la care

transmiterea substanţelor protectoare de la mamă la făt este imposibilă. Unele excepţii la această regulă pare a face oaia (Fiege, 1953). In a doua grupă intră omul, maimuţa, rozătoarele etc., la care placenta este hemocorială şi impregnarea directă a epiteliului corial prin sîngele matern uşurează trecerea acestor substanţe; în fine, în a treia grupă sînt clasate cerbul, cîinele şi pisica, animale cu o placentă de tip endoteliocorial şi care ocupă un loc intermediar între cele două grupe precedente. Pe baza structurii histologice a placentei, Grosser (1925) a împărţit mamiferele în patru grupe, iar Mossmann (1926) în cinci grupe. In clasificaţia autorului din urmă, prima grupă este constituită de cal şi porc (placentă epiteliocorială cu şase straturi histologice plus lumenul uterin), a doua de rumegătoare (placentă sindesmocorială cu cinci straturi histologice), a treia de cîine şi pisică (placenta endoteliocorială cu patru straturi histologice), a patra de om (placentă hemocorială, cu trei straturi histologice) şi a cincea de rozătoare (placentă hemoendotelială cu un singur strat histologic). Trecerea anticorpilor în timpul vieţii embrionare se face cu regularitate la om, iepure şi cobai, astfel că la naştere serul sanguin al fetuşilor are acelaşi conţinut ca şi serul matern (Brambell şi col. 1948, 1949, 1950, 1951). La cal, măgar, porc şi rumegătoare, această trecere se face numai după naştere, prin laptele colostral. Bîntoiu a arătat, în acest sens, încă din 1916, că la cal transmiterea anticorpilor prin filtrul placentar nu are loc. El, într-adevăr, nu găseşte anticorpi rujetici în serul sanguin al unui avorton în vîrstă de 10 luni şi provenind de la o iapă hiperimunizată antirujetic. Transmiterea prin laptele colostral, pare mult mai constantă atît pentru antitoxine cît şi pentru substanţele antibacteriene. In ceea ce priveşte substanţele antibacteriene, Bîntoiu a arătat, că mînjii, care sug la iepe hiperimunizate contra rujetului, conţin, în serul lor sanguin, o cantitate de anticorpi capabilă să neutralizeze o infecţie severă la porumbel. Anticorpii sînt prezenţi 10 zile după naştere şi persistă, într-o cantitate apreciabilă, pînă la 2 luni, pentru a dispărea după 3 luni. Astfel, serul recoltat, cînd mînzul avea 10 zile, proteja, în doza de 0,5 ml, doi porumbei din trei ; cel recoltat cînd mînzul avea 60 de zile proteja porumbelul în doze de 0,5 şi 1 ml, dar nu în doza de 0,25 ml ; serul recoltat cînd mînzul avea 90 de zile nu mai proteja porumbelul nici în doză de 2 ml. Schneider şi Szathmary (1939, 1940) cît şi Parisis (1953) ajung la concluzii similare cu privire la transmiterea antitoxinei tetanice de la iepe la mînz prin colostru şi lapte. Antitoxinele persistă în organismul mînzului pînă la 11 luni. Howe (1921), Orcutt şi Howe (1922) fac constatări similare la vacă. Viţelul, în momentul naşterii, înainte de primul supt, nu conţine anticorpi, chiar dacă provine dintr-o vacă care are un titru ridicat, de exemplu, de aglutinine antibrucelice. După ce suge colostrul, titrul în anticorpi începe să crească, depăşind uneori chiar titrul sanguin matern.

Transmiterea prin lapte nu se poate face, bineînţeles, numai între mamă şi făt, acesta din urmă putînd primi principiile defensive şi prin laptele unui alt individ, dar care, foarte probabil, trebuie să facă parte din aceeaşi specie.

Se pare că nu pot beneficia de această transmitere prin lapte decît animalele tinere la care este posibilă pătrunderea substanţelor antiinfecţioase, din stomac şi intestin, în circulaţia generală. Harms (1942) afirmă că din laptele matern, aceste substanţe nu trec în circulaţia generală decît în

primele 36 de ore după naştere. După acest interval de timp, datorită modificărilor suferite de pereţii tubului intestinal, ele nu mai trec în circulaţie şi sînt dezintegrate prin enzimele aparatului gastrointestinal, pierzînd astfel orice activitate antibacteriană. În acelaşi sens, Mc. Diarmids (1946) constată că la viţeii, care sug de la vaci imune, titrul anticorpilor sanguini atinge punctul cel mai înalt la 24 ore după naştere, pentru a scădea apoi treptat pînă la totala dispariţie.

Transmiterea pasivă a stării de imunitate a fost constatată şi la păsări. Lihacev şi colaboratorii (1953) constată, în acest sens, că puii, în vîrstă de 1—2 zile, care au ieşit din ouă provenind de la găini vaccinate cu virus pseudopestos atenuat, rezistă, în proporţie de 85%, la o infecţie de control. Această stare de rezistenţă dispare însă după 30 de zile de la ecloziune.

Scanned with OKEN Scanner

CREAREA STĂRILOR DE IMUNITATE DOBÎNDITĂ

Un organism receptiv faţă de un microb poate deveni imun faţă de el fie prin contactul cu microbul sau cu produsele de secreţie (imunitate activă), fie primind principii antiinfecţioşi preparaţi de un alt organism (imunitate pasivă).

CREAREA STĂRILOR DE IMUNITATE DOBÎNDITĂ ACTIVĂ

Imunitatea activă se poate instala în cursul procesului infecţios, deci pe cale naturală, sau printr-o operaţie de vaccinare, deci pe cale artificială.

Imunitatea dobîndită în urma unei infecţii este, în general, solidă, însă ea are dezavantajul că pune în pericol viaţa individului infectat şi, în orice caz, îi reduce puterea de muncă pe un timp mai lung sau mai scurt şi, în plus, îi poate lăsa leziuni anatomice ireparabile.

Pentru acest motiv se evită, pe cît posibil, procesul natural de imunizare. Totuşi, în anumite infecţii, în special umane, din cauza lipsei unor vaccinuri, procesul natural de imunizare prin infecţie este singurul mijloc prin care indivizii dobîndesc o stare de imunitate. Acesta este, de exemplu, cazul maladiilor eruptive ale copiilor.

Mai trebuie amintit aici că nu orice infecţie lasă în urma ei o stare de rezistenţă. Un organism vindecat de sifilis, de exemplu, are, faţă de agentul infecţios al sifilisului, aceeaşi sensibilitate ca şi înainte de infecţie.

Crearea stărilor de imunitate activă prin vaccinuri, în opoziţie cu procesul de imunizare naturală, nu periclitează viaţa organismului, nu-i produce leziuni ireparabile şi nu-i reduce, decît pentru un timp scurt, capacitatea de muncă. Pentru aceste motive acest mijloc artificial de imunizare a luat, în timpurile noastre, o extindere foarte mare. Produsele prin care se creează asemenea stări de imunitate se numesc *vaccinuri*.

VACCINURILE

Vaccinul este un produs biologic constituit fie din germeni vii şi virulenţi, fie din germeni vii şi atenuaţi, fie din germeni inactivaţi, fie, în fine, din secreţii microbiene, şi care inoculat unui organism îi produce o stare

Scanned with OKEN Scanner

de imunitate față de microbul patogen din care vaccinul provine, fără a-i produce tulburări grave și leziuni ireparabile. Vaccinurile își datoresc, în general, capacitatea lor imunizantă însușirii, de a produce, în organism, o reacție locală și generală asemănătoare cu cele întîlnite în boala naturală, dar care are un caracter mult mai benign.

După felul de preparare și după natura elementului activ deosebim diferite feluri de vaccinuri.

1. **Vaccinuri preparate din germenii vii și virulenți.** Există germeni care, deși au toate atributele patogenității, caracteristice speciei căreia aparțin, nu produc infecții mortale cînd sînt administrați, fie pe anumite căi, fie în anumite sezoane. Astfel, agentul peripneumoniei bovideelor *(Borrelomyces peripneumoniae)*, așa cum a arătat Williams, încă din 1852, produce o slabă reacție locală, vindecabilă, cînd este inoculat la vîrful cozii (regiune săracă în țesut conjunctiv) ; acest fel de administrare imunizează animalul fără a-i pune viața în pericol. Virusul variolei ovine injectat intradermic la oi receptive în sezonul de toamnă — septembrie — produce, de regulă, o pustulă care evoluează ca un proces local benign și care conferă animalului o solidă stare de imunitate.

Folosirea germenilor vii și virulenți nu se mai practică astăzi decît pe o scară foarte restrînsă, metoda prezentînd două dezavantaje esențiale și anume :

— creează purtători de germeni și focare de infecție ;

— uneori dă naștere la accidente grave.

2. **Vaccinuri preparate din germeni vii dar atenuați.** Pasteur introduce în profilaxia bolilor infecțioase vaccinurile constituite din germeni atenuați, adică din germeni care nu produc o infecție de gravitatea celei date de germenii virulenți, dar care provoacă în organism o reacție suficientă instalării imunității. Primul vaccin de acest fel a fost cel antiholeric aviar. Un al doilea vaccin a fost cel anticărbunos pe care tot Pasteur l-a obținut cultivînd o tulpină virulentă de bacili ai cărbunelui la 42° C. Vaccinul antirabic este obținut de Pasteur prin treceri pe animale și anume pe creier de iepure. Tot prin treceri pe iepure el obține și o atenuare a bacilului rujetului. Cercetări ulterioare au arătat că cei mai mulți germeni se pot atenua, în anumite condiții de mediu, ceea ce a permis să se obțină tulpini vaccinale dintr-un număr însemnat de microbi patogeni.

3. **Vaccinuri preparate din germeni inactivați.** Unele specii microbiene nu pot fi atenuate și transformate în vaccinuri și, în aceste cazuri, se recurge, în vederea preparării vaccinurilor, la corpii microbieni inactivați, adică tratați în așa fel încît sînt incapabili, în condițiile în care se aplică vaccinarea, să producă o infecție clinică. Inactivarea germenilor se face prin căldură, diverse radiații și mai ales prin antiseptice. Rezultatele date de asemenea vaccinuri sînt uneori satisfăcătoare, alteori slabe, în sensul că imunitatea consecutiv instalată este redusă sau este prezentă la un procent redus de organisme injectate. Asemenea vaccinuri se folosesc, de exemplu, în imunizarea oamenilor contra febrei tifoide și paratifoide, vaccinul T.A.B., în imunizarea păsărilor și mamiferelor contra pasteurelozelor și salmonelozelor etc.

4. **Vaccinuri preparate din secreții bacteriene.** Exotoxinele unor specii bacteriene se transformă, sub influența căldurii și formolului, în anatoxină, produs lipsit de toxicitate, dar avînd o însemnată valoare vaccinantă. Ase-

Scanned with OKEN Scanner

menea produse au o largă utilizare în combaterea unor boli la om şi animale. Astfel profilaxia difteriei la om şi a tetanosului la om şi animale, se sprijină, într-o largă măsură, pe imunizarea organismelor receptive cu ajutorul anatoxinelor respective, anatoxina difterică şi anatoxina tetanică. Agresinele unor specii bacteriene, în special agresina bacilului cărbunelui, au importante însuşiri vaccinante.

5. **Vaccinuri cu substanţe adjuvante.** Se numesc adjuvante, în tehnica preparării vaccinurilor, acele substanţe, care, fără a avea o legătură chimică cu un complex vaccinant, îi ridică foarte mult valoarea sa imunizantă. Substanţele adjuvante cele mai folosite sînt hidroxidul de aluminiu, saponina, geloza şi clorura de calciu.

Introducerea substanţelor adjuvante în practica preparării serurilor imune şi a vaccinurilor îşi are, se pare, originea în observaţiile făcute de Ramon (1925), observaţii din care rezultă că la caii la care injecţia de toxină difterică era urmată de un proces inflamator de natură infecţioasă (infecţie accidentală cu germeni piogeni), producţia de antitoxine era mai mare decît la caii care nu prezentau asemenea procese. In urma acestei observaţii, Ramon introduce la caii donatori de ser antitoxic, o dată cu antigenul, substanţe ca tapioca sau clorura de calciu, care creează o inflamaţie locală similară cu aceea produsă printr-o infecţie bacteriană obţinînd, în acest fel, în mod constant, seruri cu un titru antitoxic foarte ridicat. In 1926, Glenny şi colaboratorii constată că anatoxina difterică îşi măreşte mult valoarea antigenică dacă, în loc de a fi inoculată sub formă de soluţie, este administrată sub forma unui precipitat obţinut prin adăugarea alaunului [sulfat de aluminiu şi potasiu — $(SO_4)_2$ AlK + 12 H_2O] în proporţie de 1—2%.

Au urmat apoi lucrările lui Mazzucchi (1929) care, tot în scopul creării unui focar inflamator local (capabil să incite o mai accentuată stare de imunitate), asociază sporii bacilului cărbunelui cu saponină, obţinînd bune rezultate. Rhodes (1931) foloseşte hidroxidul de aluminiu pentru a prepara un vaccin capabil să imunizeze maimuţele contra poliomielitei. Autorul constată că amestecul de virus poliomielitic şi hidroxid de aluminiu (fără nici un antiseptic) nu este patogen pentru maimuţă, dar este imunizant. Galea (1932) amestecă virusul febrei aftoase cu oleu de vaselină şi praf de infuzori, reuşind să imunizeze cobai cu un asemenea amestec. Schmidt, Jensen şi colaboratorii (1936) imunizează activ cobai contra febrei aftoase cu un amestec de virus aftos şi hidroxid de aluminiu, amestec care nu conţinea nici un inactivant pentru virus. Schmidt şi Oerskov au imunizat găinile şi şoarecii contra pestei aviare cu material virulent, în amestec cu hidroxid de aluminiu. Plecîndu-se de la aceste lucrări de bază, s-a ajuns la prepararea unei serii întregi de vaccinuri cu substanţe adjuvante.

Gelul de hidroxid de aluminiu este, după unii autori, un hidroxid de aluminiu [Al $(OH)_3$], iar după alţii, un oxid de aluminiu (Al_2O_3) hidratat. El rezultă din precipitarea alaunului [$(SO_4)_2NH_4Al$] prin NaOH sau NH_4OH şi eliminarea, consecutivă, prin spălări, a anionului SO_4. Se prepară după tehnica lui Wilstätter, Goret sau Goret-Georgescu sau Hansen şi Schmidt (1935). Gelul este o soluţie coloidă, de culoare albă-lăptoasă, care se sedimentează cînd este lăsată în repaus. Are însemnate proprietăţi adsorbante faţă de virusurile filtrabile, toxinele bacteriene,

proteinele serice, fermenţi, substanţe colorante etc. Aceste proprietăţi sînt condiţionate de modul de preparare al hidroxidului, de însuşirile sale, aşa cum reiese şi din lucrările făcute de V. Georgescu (1950) care a organizat producţia industrială a acestui adjuvant la noi în ţară.

Virusurile şi suspensiile bacteriene inactivate îşi măresc mult valoarea vaccinantă cînd sînt amestecate cu hidroxid de aluminiu, aşa cum reiese din foarte numeroase cercetări. Această constatare a făcut posibilă prepararea unor vaccinuri foarte active cum sînt vaccinul antiaftos, vaccinul antipestos aviar, vaccinul antipestos porcin, vaccinul antiholeric aviar etc. Principial, un vaccin adsorbit este un amestec de material virulent (splina de la porci bolnavi de pestă porcină în cazul vaccinului antipestos porcin, embrionii de găină infectaţi cu virusul pestei aviare, în cazul vaccinului antipestos aviar, culturi de *Pasteurella animalium var. avium* în cazul vaccinului antiholeric aviar etc.), gel de hidroxid de aluminiu apă sau ser fiziologic şi un antiseptic, de regulă formolul. Antisepticul se adaugă în concentraţii care asigură inactivarea microbilor (abolirea capacităţii lor infectante).

Mecanismul prin care hidroxidul de aluminiu măreşte valoarea imunizantă a unor antigeni nu este pe deplin lămurit. Unii cercetători admit că virusul este încă viu în produsul vaccinal şi el poate fi recuperat, în anumite condiţii, de la animalele vaccinate. Leonov a arătat, în acest sens, că vaccinul antipestos aviar, adsorbit şi inactivat prin formol, produce leziuni asemănătoare celor găsite în infecţiile cu virus pestos. Asemenea leziuni nu apar însă în urma injectării aceluiaşi vaccin, în prealabil fiert, vaccin care, de altfel, nu produce nici imunitate. Rezultate similare a obţinut Jernosec cercetînd vaccinul antiaftos adsorbit pe hidroxid de aluminiu. După acest autor, proprietăţile imunogene ale vaccinului antiaftos, adsorbit pe hidroxid de aluminiu, sînt în legătură directă cu însuşirea sa de a produce o formă slabă, dar specifică de boală. În producerea imunităţii, reacţia inflamatorie locală este socotită de o mare importanţă. În sprijinul acestei teze se citează experienţele din care rezultă că la cobai nu se instalează o stare de imunitate atunci cînd nodulul, creat prin inocularea anatoxinei difterice în amestec cu alaun, se extirpă la 3 zile după inoculare. Nodulul inflamator local nu pare să aibă însă în toate cazurile şi la toate speciile animale un rol aşa de important. Popovici şi Gogoaşă (1955) observă, de exemplu, că şoarecii se imunizează în proporţii însemnate contra pasteurelei, chiar în cazul cînd nodulul local este extirpat după 5 ore de la inoculare. Autorii mai constată că materialul extirpat este lipsit de valoare imunizantă. Aceste date îi fac să conchidă că antigenii se desprind repede de la locul de inoculare şi difuzează în tot organismul, ajungînd în elementele imunoformatoare. Problema modului de acţiune a hidroxidului de aluminiu pare deci foarte complexă.

Ceea ce se poate spune cu siguranţă este că un antigen îşi măreşte mult capacitatea sa imunizantă atunci cînd este fixat pe particule coloidale de hidroxid de aluminiu. După unele cercetări, chiar substanţe considerate ca neantigenice, cum este colesterolul, pot deveni antigenice atunci cînd pătrund în organism împreună cu hidroxidul de aluminiu, cînd sînt deci fixate pe particule de hidroxid de aluminiu. De asemenea, tuberculina purificată constituită din molecule avînd greutatea moleculară de 3 800, este antigenică în amestec cu hidroxidul de aluminiu.

Scanned with OKEN Scanner

Saponina este un glucozid cu proprietăţi hemolitice şi necrozante. Adăugată, în doze convenabile, unor suspensii vaccinale, ea măreşte mult valoarea lor vaccinantă. Astfel se comportă suspensiile de bacilii cărbunelui şi de pasteurele.

Geloza amplifică capacitatea imunizantă a unor suspensii de germeni vaccinali şi se foloseşte în prepararea vaccinului anticărbunos şi vaccinului antirujetic.

Clorura de calciu măreşte capacitatea imunizantă a anatoxinei tetanice.

CONDIŢIILE PE CARE TREBUIE SĂ LE ÎNDEPLINEASCĂ UN BUN VACCIN

Un vaccin, pentru a putea fi utilizat în practică, trebuie să îndeplinească următoarele condiţii :

1. să nu fie nociv ;
2. să fie activ ;
3. să poată fi preparat în cantităţi industriale ;
4. să aibă o valabilitate convenabilă.

Un vaccin trebuie deci să imunizeze, dar nu trebuie să producă accidente mortale sau îmbolnăviri grave la organismele la care se inoculează. Pentru a se realiza aceste condiţii, biofabricile iau toate măsurile de control necesare. Astfel, vaccinurile se prepară după protocoale anumite. Tulpinile microbiene folosite nu se pot schimba şi înlocui decît după cercetări minuţioase şi cu aprobarea organelor de control. În plus, fiecare serie de vaccin sau grup de serii se controlează, atît în ceea ce priveşte inocuitatea adică lipsa de nocivitate a produsului, cît şi în ceea ce priveşte valoarea sa imunizantă. Controlul se face după norme stabilite şi aprobate de organele de control. Aceste măsuri asigură obţinerea unor produse nepericuloase şi de o însemnată valoare imunizantă.

CREAREA STĂRILOR DE IMUNITATE DOBÎNDITĂ PASIVĂ

SERURILE IMUNE

O dată făcută constatarea că un organism, prin contactul cu un germen patogen, fabrică substanţe care neutralizează activitatea nocivă a acelui germen şi că aceste substanţe se găsesc în serul sanguin al animalului respectiv, s-a trecut la prepararea, pe scară industrială, a serurilor cu activitate antiinfecţioasă (antitoxică sau antimicrobiană). Aceste seruri se numesc cu un termen generic seruri imune sau hiperimune şi s-au folosit şi se folosesc încă pe o scară întinsă în scopul creării stărilor de imunitate pasivă. Behring (1890) a preparat primul ser cu largi aplicaţii practice şi anume serul antidifteric şi acest autor este socotit ca descoperitorul seroterapiei, deşi alţi cercetători şi în primul rînd Babeş şi Lepp (1889) au arătat proprietăţile antiinfecţioase pe care le are serul sanguin al animalelor activ imunizate. Babeş şi Lepp au constatat, într-adevăr, că inoculînd cîinilor, timp de 6 zile la rînd, sînge provenind de la cîini vaccinaţi contra turbării, se obţine o stare de imunitate aşa de solidă încît animalele tratate cu un asemenea sînge rezistă la o injecţie subdurală cu virus de stradă. Prin această cercetare, ei descoperă primul ser antivirotic. După aceste cercetări fundamentale a urmat prepararea altor seruri ca : antitetanic (1891), antirujetic (1893), anticărbunos (1895) etc.

Scanned with OKEN Scanner

Principial, pentru a prepara un ser imun, se inoculează, unui organism animal, în repetate rînduri, doze din ce în ce mai mari de germeni sau toxine. De exemplu, pentru a prepara un ser antirujetic se inoculează unui cal, pe cale intravenoasă şi la interval de 1 săptămînă, 50, 50, 100, 100, 200, 200 şi 250 ml de cultură în bulion de 24 de ore de bacili ai rujetului virulenţi.

Organismul animal şi germenul, folosiţi la prepararea serului, nu pot fi luaţi la întîmplare. Pentru fiecare fel de ser se alege o anumită specie animală, iar germenul folosit la operaţia de imunizare trebuie să aibă şi el anumite însuşiri. La fel, nu sînt indiferente calea de administrare a germenului sau toxinei, cantităţile administrate, intervalele care separă o injecţie de alta, substanţele cu care germenii sau toxina se găsesc în amestec, starea de întreţinere a animalelor donatoare de ser etc. Numai respectînd toate recomandările ştiinţei imunologice se asigură prepararea unor seruri active. Adoptarea principiilor pavloviste în biologie a adus, în tehnica preparării serurilor, modificări care permit obţinerea unor produse de o mai mare valoare.

Cele mai multe seruri se prepară pe cal— serul anticărbunos, antirujetic, antitetanic etc. Unele seruri nu se pot prepara însă pe cal din cauză că această specie nu fabrică substanţe antiinfecţioase decît pentru anumiţi germeni. Astfel, nu s-a putut obţine pe cal un ser antipestos porcin, ci numai pe porc ; la fel, un ser antivariolic ovin nu se poate obţine decît pe oaie. S u r d a n şi colaboratorii (1952) au încercat să prepare un ser antipestos aviar pe oaie, porc şi gîscă, dar nu au reuşit. Serul obţinut inhiba hemoaglutinarea, dar nu avea valoare protectoare nici pentru embrioni şi nici pentru păsările adulte. In general, serurile antivirotice nu se obţin decît pe speciile animale natural receptive, în timp ce serurile antitoxice şi antibacteriene se pot obţine şi pe specii natural nereceptive. Astfel, calul nu este receptiv, în condiţii naturale, faţă de bacilul rujetului sau faţă de toxina bacilului difteriei, dar el reacţionează faţă de aceste produse cînd sînt injectate parenteral şi de aceea dă un ser antirujetic sau un ser antidifteric foarte activ.

Un ser imun, pentru a putea fi folosit în prevenirea şi tratamentul infecţiilor umane sau animale trebuie să îndeplinească următoarele condiţii :

— să fie steril sau, în orice caz, să nu conţină germeni patogeni ;

— să fie activ, adică să aibă o anumită capacitate neutralizantă faţă de toxina sau germenul cu care a fost preparat.

Sterilitatea unui ser se asigură prin respectarea unor măsuri riguroase de asepsie în recoltarea sîngelui şi a serului sanguin, prin supunerea la dietă a animalelor înainte de sîngerare, prin alegerea animalelor donatoare de ser. Animalele donatoare de ser trebuie să fie indemne de orice boală infecto-contagioasă. In special caii trebuie să fie indemni de anemie infecţioasă şi morvă, bovinele indemne de tuberculoză şi bruceloză, porcii de boala lui Aujeszky etc. O atenţie deosebită trebuie acordată anemiei infecţioase a calului, deoarece virusul acestei infecţii prezintă cel mai mare pericol în ceea ce priveşte posibilitatea de transmitere prin serurile imune. Pericolul este mare, în primul rînd, din cauză că animalele purtătoare de virus nu prezintă uneori nici un simptom clinic şi nu pot fi deci diagnosticate (animale anemolatente), iar, în al doilea rînd, virusul se conservă timp îndelungat chiar în serurile fenolate. Pentru aceste mo-

tive serurile provenind de la animale suspecte de anemie infecţioasă nu se folosesc decît după un stocaj de cel puţin 10 luni.

Serurile care conţin bacterii şi care nu se sterilizează prin adăugarea de antiseptice, în concentraţia admisă de protocoale, se pot steriliza prin filtrare.

Unele seruri care prin modul cum se obţin (serul antipestos porcin, de exemplu), nu sînt sterile, se pot totuşi folosi cu condiţia ca să nu conţină bacterii sau virusuri patogene.

Serurile se conservă la întuneric şi la temperatură joasă, 4—8°C, şi trebuie ferite de îngheţ. Isopescu (1949) a arătat, în acest sens, că unele seruri îşi reduc activitatea lor prin îngheţări şi dezgheţări succesive. Serul anticărbunos pierde, de exemplu, 50% din valoarea sa după 10—15 îngheţări şi dezgheţări. Serul antirujetic nu este influenţat, după autor, prin îngheţări şi dezgheţări repetate.

Activitatea antiinfecţioasă a unui ser trebuie măsurată înainte ca biofabrica producătoare să-l dea în folosinţă practicii. Măsurarea valorii antiinfecţioase a unui ser poartă numele de titrare.

Necesitatea titrării decurge din constatarea că inocularea aceleiaşi toxine sau aceluiaşi microb, în aceleaşi condiţii, la diferite animale, din aceeaşi specie, nu asigură, la fiecare animal în parte, o producţie egală de principii antiinfecţioşi. Un animal produce o cantitate mai mică de asemenea principii, altul mai mare. Aceste diferenţe sînt în legătură cu o serie de factori, endogeni sau exogeni, cum sînt tipul constituţional al animalului, starea sistemului său nervos, alimentaţia, condiţiile de adăpostire etc. Unele observaţii, de exemplu, tind să arate că în timpul verii caii ţinuţi la păşune dau un ser antirujetic mai activ decît în timpul iernii, cînd sînt ţinuţi la grajd şi hrăniţi cu alimente uscate. Animalele slabe, epuizate, dau, în general, un ser imun puţin activ.

Aceste diferenţe relativ la conţinutul unui ser imun în principii antiinfecţioşi, diferenţe care sînt datorite atît animalului cît şi toxinei sau microbului folosit, căii sale de administraţie etc. au impus necesitatea titrării serurilor, determinării valorii lor antinfecţioase, căci numai cunoscînd această valoare ele pot fi judicios folosite în prevenirea şi tratamentul bolilor microbiene.

Metodele de titrare variază de la un ser la altul şi uneori, pentru acelaşi ser, se folosesc, în diverse ţări, metode diferite. Întrebuinţarea metodelor diferite prezintă importante inconveniente prin aceea că împiedică circulaţia serurilor şi face dificilă folosirea lor. Este de dorit ca ele să fie înlăturate şi, în acest scop, este necesar ca pentru măsurarea valorii unui ser să fie o măsură mondial adoptată. Aceasta ar permite compararea serurilor preparate în diverse institute şi folosirea lor judicioasă, căci ceea ce importă în prevenirea sau tratamentul unei boli nu este volumul de ser injectat ci cantitatea de principii antiinfecţioşi conţinuţi în volumul administrat. Cantitativ, un ser activ va fi injectat într-o doză mai mică ca un ser puţin activ; pentru a avea acelaşi efect preventiv sau terapeutic este necesar ca cele două volume să conţină aceeaşi cantitate de principii activi.

Standardizarea metodelor de titrare şi de exprimare a valorii unui ser a fost realizată, pentru unele din ele, cum sînt, în special, serurile antidifteric, antitetanic etc. Valoarea acestor seruri se exprimă în unităţi internaţionale. Unele seruri antitetanice conţin, de exemplu, 1 000 UI pe 1 ml,

Scanned with OKEN Scanner

altele 2 000, 3 000 sau mai mult. Doza necesară prevenirii tetanosului este de 3 000 UI pentru om, 12 500—25 000 pentru cal, 3 000—6 000 pentru oaie şi porc. Cunoscînd că unitatea internaţională de antitoxină este aceeaşi pentru toate institutele din lume, un ser antitetanic, avînd notată pe eticheta fiolei care îl conţine numărul de unităţi pe 1 ml, poate fi folosit în doza necesară scopului urmărit.

Standardizarea nu s-a realizat decît pentru puţine seruri şi, în consecinţă, cele mai multe dintre ele se titrează după metode proprii diverselor institute sau ţări.

Metodele de titrare a serurilor imune sînt numeroase; ele pot fi împărţite în două grupe: metode de titrare in vitro, metode de titrare in vivo.

Dintre metodele de titrare in vitro, metoda floculării dă, în cazul serului antidifteric rezultate foarte precise.

Titrarea serului antidifteric prin metoda floculării. O lungă experienţă a arătat că un ser antidifteric poate conţine un număr variabil de unităţi floculante într-un mililitru (500—2 000), în timp ce o toxină (filtrat de cultură) conţine pe unitatea de volum un număr mult mai mic de unităţi floculante, în medie 20—50 unităţi floculante. Pentru ca să ajungem ca cele două lichide să aibă un număr apropiat de unităţi floculante, este deci necesar să diluăm serul cu apă fiziologică în aşa fel încît 1 ml de lichid să conţină 100 unităţi antitoxice. Serul astfel diluat se repartizează în doze crescînde în 10 tuburi şi anume: în primul tub 0,1, în al doilea 0,2 şi în ultimul 1 ml. Se adaugă apoi apa fiziologică necesară pentru a completa volumul la 1 ml în primele nouă tuburi şi se distribuie, în cele din urmă, în fiecare tub cîte 2 ml de toxină. Tuburile se agită bine şi se pun la 52°C într-o baie de apă. Citirea se face la intervale foarte scurte, de regulă din 2 în 2 minute, notîndu-se tubul în care se produce întîi flocularea. Admiţînd că flocularea apare întîi în tubul al şaselea care conţine 0,6 ml de ser diluat se face calculul unităţilor floculante printr-o regulă de trei simplă:

$$\frac{0{,}6 \times 100}{2} = 30 \text{ U.}$$

In cazul cînd flocularea apare la unul din tuburile de la extremitatea dreaptă sau stîngă înseamnă că toxina conţine respectiv mai multe sau mai puţine unităţi decît cele care se găsesc în dozele de ser distribuite în tuburi şi atunci se repetă experienţa cu alte diluţii de ser pînă ce se obţine diluţia în care prima floculare apare într-un tub încadrat la dreapta şi la stînga de tuburi fără floculare.

O unitate antitoxică este echivalentă cu o unitate floculantă de toxină. O unitate floculantă de toxină este egală cu 100 d.l.m. pentru cobaiul de 250 g. O unitate antitoxică neutralizează, in vivo, o unitate toxică adică 10 d.l.m. de toxină.

Titrarea, in vivo, pe animale de experienţă dă rezultatele cele mai satisfăcătoare posibile. Metoda permite titrarea serurilor antitoxice şi antibacteriene. In linii generale, metoda nu diferă de la un ser la altul şi ea constă în a stabili cantitatea minimă de ser capabilă să oprească dezvoltarea unei infecţii sau intoxicaţii făcută simultan, înainte sau după injectarea serului. Cu cît această cantitate este mai mică, cu atît serul este mai activ. Rezultatele obţinute pe animale de experienţă sînt, în mare măsură, valabile pentru om şi animale domestice, în sensul că un ser activ la primele dă rezultate şi la cele din urmă.

Scanned with OKEN Scanner

In amănunt condiţiile materiale de titrare variază de la un ser la altul. Specia animală folosită, greutatea animalului, starea sa de întreţinere, calea şi timpul de administrare a toxinelor sau microbilor, capacitatea toxică sau infectantă a acestora etc. influenţează, într-o mare măsură, rezultatul unei titrări. Pentru fiecare ser se alege o anumită specie animală. Astfel, serul antitetanic se poate titra pe şoareci sau cobai ; serul anticărbunos pe şoareci, cobai sau iepuri ; serul antirujetic pe şoareci sau porumbei etc. Greutatea şi vîrsta acestor animale nu este fără importanţă. Sezonul în care se face titrarea influenţează rezultatul titrării. Acelaşi ser antirujetic, de exemplu, protejează porumbelul într-o doză mai mică vara decît iarna. La fel, cobaii sînt protejaţi, faţă de aceeaşi doză de bacili ai cărbunelui, cu o doză mai mică de ser vara decît iarna. Tulpinile microbiene sau toxinele folosite la diverse titrări nu pot fi mereu aceleaşi din cauză că ele se modifică în timp şi nu pot fi deci folosite, ca atare, timp îndelungat. Titrul unui ser depinde, în consecinţă, şi de acest factor.

In consecinţă, pe lîngă valoarea intrinsecă a unui ser, intervin, în procesul de protecţie, o serie de alţi factori, din care unii de cea mai mare importanţă. Pentru a neutraliza influenţa acestor factori este necesar ca paralel cu titrarea unui ser necunoscut să se titreze, pe un lot de animale, un ser a cărui valoare protectoare este cunoscută. Un asemenea ser se păstrează sub formă uscată, timp de cîţiva ani. El poate fi preparat de însuşi institutul preparator de seruri sau, pentru serurile de mare întrebuinţare, el se poate obţine de la un institut care se ocupă special cu prepararea serurilor standard. Rezultatele titrării se raportează la serul standard. Astfel, să admitem că serul antirujetic standard protejează porumbelul în doza de 0,1 ml faţă de doza de cultură care omoară porumbelul martor în 48—72 de ore. Făcînd o titrare iarna se poate ca doza protectoare, chiar pentru serul standard, să nu fie de 0,1 ml, ci 0,2 sau 0,3 ml ; dacă serul necunoscut protejează în aceeaşi doză înseamnă că el are aceeaşi valoare ca şi serul standard şi că deci este un ser bun şi poate fi folosit în doza prescrisă de institutul de la care provine. Acelaşi ser standard titrat vara poate avea totuşi o doză minimă protectoare mai mare decît cea indicată, din cauză că tulpina folosită este prea virulentă. Şi în acest caz serul de titrat corespunde necesităţilor, dacă el se comportă ca şi serul standard.

Serurile imune active faţă de virusurile filtrabile nu pot fi, de regulă, titrate decît pe animale domestice receptive. Serul antipestos porcin se titrează pe porc ; serul antivariolic ovin pe oaie etc.

Iată protocolul de titrare a *serului antipestos porcin,* aplicat de Institutul „Pasteur" din Bucureşti.

O serie de ser se titrează pe 12 purcei, împărţiţi în patru loturi, cîte trei purcei în fiecare lot.

Purceii din fiecare lot se injectează astfel :

— trei purcei cu cîte 0,25 ml de ser pe 1 kg de greutate vie + 2 ml de virus ;
— trei purcei cu cîte 0,50 ml de ser pe 1 kg de greutate vie + 2 ml de virus ;
— trei purcei cu cîte 0,75 ml de ser pe 1 kg de greutate vie + 3 ml de virus ;
— trei purcei martori se înjectează numai cu virus şi anume cu cîte 2 ml de fiecare purcel.

Serul şi virusul se injectează simultan pe cale subcutanată, în puncte separate. Purceii trebuie să fie receptivi la virusul pestei, adică să nu fi fost

vaccinaţi sau bolnavi de pestă. Ei trebuie să fie în vîrstă de cîteva luni şi să cîntărească 20—50 kg.

Purceii injectaţi cu virus sau cu ser şi virus sînt ţinuţi sub observaţie 21 de zile.

Titrarea este valabilă cînd toţi purceii martori (lotul 5) mor de pestă.

Serul poate fi folosit în prevenirea şi tratamentul pestei cînd :

1. protejează perfect toţi purceii injectaţi cu 0,5 şi 0,75 ml de ser pe 1 kg de greutate vie ;

2. nu protejează unul sau doi purcei din loturile 2 şi 3, în schimb unul sau doi purcei din lotul 1 (injectaţi cu 0,25 ml pe 1 kg de greutate vie) nu fac pestă ;

3. pentru fiecare purcel mort în loturile 1, 2 şi 3 există doi purcei care au suportat, fără a prezenta febră, injecţia de ser şi virus.

Serul antivariolic ovin se titrează pe oi, în felul următor : se amestecă aceeaşi cantitate de virus cu cantităţi diferite de ser imun ; se adaugă, în fiecare tub, ser fiziologic atît cît este necesar pentru a avea acelaşi volum în toate tuburile. Amestecul este păstrat 1 oră la temperatura camerei şi apoi se injectează fiecare amestec la una sau mai multe oi sensibile. Doza injectată, din fiecare amestec, este de 0,1 ml. Administrarea se face pe cale intradermică.

Citirea rezultatului se face după 6—8 zile, notîndu-se doza minimă din fiecare ser care a oprit apariţia pustulei variolice. Un ser activ trebuie să inhibeze apariţia pustulei în doză de cel mult 1 ml.

Rezultatele obţinute în titrarea cîtorva seruri antivariolice sînt date în tabelul 37.

Tabelul 37

Rezultatele titrării cîtorva seruri antivariolice

Nr. oilor folosite	Seria serului titrat	Originea serului	Doza de ser amestecată cu 1 ml, dintr-o dilutie 1/20 de limfă virulentă (doza minimă infectantă : 1/100 000)			
			0,5 ml	1 ml	2 ml	4 ml
7	4 A	Ser de convalescent	+++	+++	+++	—
	3	Ser hiperimun	—	—	—	—
	4	Ser hiperimun	+++	—	—	—
	5	Ser hiperimun	—	—	—	—

Explicaţia semnelor :
— nu s-a produs pustulă, deci doza respectivă de ser a neutralizat total virusul.
*** s-a produs pustulă, doza de ser nu a neutralizat virusul care a putut, în acest fel, produce leziunea focală.

Datele din tabelul 37 arată că serurile antivariolice obţinute de la diverse animale nu au aceeaşi valoare neutralizantă şi că serul de convalescent este mult mai puţin activ ca serul hiperimun.

Rezultatele unor asemenea titrări depind, într-o mare măsură, de gradul de receptivitate a animalelor şi de aceea este necesar ca pe acelaşi animal, pe lîngă serul necunoscut, să se titreze şi un ser standard.

MODALITĂŢILE DE FOLOSIRE A SERURILOR IMUNE

Serurile, în vederea creării stărilor de imunitate pasivă, se administrează pe cale parenterală, folosind, în acest scop, căile subcutanată, intra-

peritoneală, intraduralâ, intravenoasă etc. Calea bucală este improprie pentru motivul că principii antitoxici şi antibacterieni ce se găsesc într-un ser imun sînt degradaţi, o dată cu proteina serică în care sînt incluşi de către fermenţii tubului digestiv, în special de către pancreatină şi secreţiile epiteliului intestinal (Carrière 1899). Principii neutralizaţi într-un ser injectat pe cale parenterală se răspîndesc, mai ales în cazul administrării intravenoase, foarte repede în tot organismul, acesta obţinînd astfel, în cîteva minute, o stare de imunitate a cărei soliditate variază de la un ser la altul, dar care, în toate cazurile, constituie pentru organism un sprijin eficace. Durata imunităţii conferită de un ser imun este scurtă şi ea nu depăşeşte, în nici un caz, 3 săptămîni. Această durată este în funcţie de viteza de eliminare a principiilor antibacterieni conţinuţi de serul imun. Serurile bogate în asemenea principii dau o imunitate pasivă care, în raport cu cele sărace în asemenea principii, se întinde pe o perioadă mai lungă de timp. Serurile imune omoloage — preparate pe specia pe care o tratăm cu ser — se elimină mai încet şi deci rezistenţa conferită de ele este de mai lungă durată ca aceea conferită de un ser heterolog. Serurile imune se pot administra fie cu scopul de a preveni o infecţie posibilă, fie de a trata o infecţie declarată, fie în asociaţie cu un vaccin, urmărind, în acest din urmă caz, crearea unei imunităţi active.

SERUMIZAREA PREVENTIVĂ

Serumizarea preventivă se aplică atît la om cît şi la animale. Astfel, la om ca şi la animalele sensibile, seroprevenţia antitetanică este foarte răspîndită. Orice plagă murdărită cu pămînt poate fi sediul unei infecţii tetanice şi pentru a o preveni se face o injecţie cu ser antitetanic. Operaţiile pe animale nu pot fi însoţite de măsuri care să excludă o infecţie tetanică şi de aceea se practică, şi în aceste cazuri, serumizarea preventivă antitetanică. La animale, seroprevenţia se practică şi în alte infecţii ca pesta porcină, febra aftoasă, variola ovină, rujet, antrax etc. Metoda este foarte eficace. Ea protejează animalele pe un timp scurt, dar, în unele cazuri, acest timp satisface necesităţile practicii. Astfel, animalele care merg în tîrguri sau la expoziţii sînt serumizate preventiv şi puse, astfel, la adăpost de boala contagioasă răspîndită în regiunea în care se găseşte animalul. Durata imunităţii conferită printr-o serumizare variază de la un ser la altul, de la o specie animală la alta (Ritivoiu, 1934).

SEROTERAPIA

Dacă reuşim, de cele mai multe ori, să prevenim o boală prin ser nu totdeauna reuşim să o vindecăm, să inactivăm, printr-un ser imun, germenii sau toxinele care s-au instalat în organism şi au dezvoltat un proces morbid. Astfel, serul antitetanic este foarte activ cînd este întrebuinţat preventiv, dar este puţin eficace în tratamentul unei intoxicaţii tetanice declarate. Toxina, în acest din urmă caz, s-a fixat pe centrii nervoşi motori, a provocat modificări organice, a produs leziuni celulare pe care antitoxina nu le mai poate repara. Aşa se întîmplă, de altfel, aproape în toate infecţiile care sînt însoţite de lezarea unor organe importante. Totuşi, aplicată la începutul infecţiei, se pot obţine rezultate pozitive. Unele infecţii se pretează mai puţin, altele mai mult la tratamentul seric. Astfel, în cărbunele

bacteridian, la om, se obţin, aproape regulat, vindecări cu ajutorul serului imun. La animale, această infecţie are o evoluţie mult mai rapidă şi mult mai gravă ca la om, de aceea şi rezultatele seroterapiei sînt mai slabe. Astfel, în antraxul oii, serul anticărbunos este aproape ineficace. Rezultatele cele mai bune sînt obţinute în antrax la bou, cal şi porc. Un ser antibacterian, extrem de activ, este cel antirujetic. Atît la porc cît şi la om se obţin, cu ajutorul lui, vindecări chiar atunci cînd boala este evoluată.

SEROVACCINAREA

Serovaccinarea a fost aplicată, pentru prima oară, în 1893, ca mijloc de imunizare activă în rujetul porcului, apoi în cărbunele bacteridian. In laborator, pe animale de experienţă se pot obţine imunizări solide, prin serovaccinare, contra multor infecţii. O extindere mare a acestei metode de vaccinare s-a obţinut prin introducerea, în unele ţări, a serovirulizării contra pestei porcine, primele încercări fiind făcute încă în anul 1905—1906. In medicina umană încercări de serovaccinare s-au făcut în pesta bubonică şi în dizenterie, neajungîndu-se la rezultate aplicabile în practică. Metoda de serovaccinare foloseşte serul imun cu scopul de a conferi organismului o rezistenţă pasivă, la adăpostul căreia să se poată inocula microbul mai mult sau mai puţin virulent. Germenul inoculat în aceste condiţii nu va da naştere la accidente, dar va putea dezvolta în organism o reacţie care să asigure instalarea unei imunităţi active. Procedeul se aplică, cu mult succes, în special la animalele domestice.

Asocierea serului cu un vaccin poate însă influenţa negativ, în unele cazuri, procesul de imunizare activă, aşa cum reiese, în special, din recentele cercetări făcute de P o p o v i c i şi G o g o a ş ă (1954). Autorii au constatat că şoarecii inoculaţi cu un ser antipasteurelic nu se imunizează prin vaccin, chiar dacă serul a fost injectat înainte sau după vaccin. Astfel, administrarea serului, chiar cu 20 de zile înainte sau după vaccinare, împiedică, parţial, instalarea imunităţii active. Această acţiune este cu atît mai pronunţată cu cît intervalul de timp ce separă injecţia serului de injecţia vaccinului este mai scurt. Asemenea procese de inhibare sau de interferenţă între imunitatea activă şi pasivă au fost semnalate şi în cazul altor antigeni şi altor seruri imune (serurile antitoxice şi anatoxinele respective, R a m o n, vaccinul antipestos porcin adsorbit şi serul antipestos porcin, W y n o h r a d n y k etc.). Aceste date arată că asocierea serului cu vaccinul nu se poate face la întîmplare, deoarece această asociere poate împiedica instalarea imunităţii active. In cazul serului şi virusului pestei porcine, serului şi culturii de rujet nu există, după cîte ştim, asemenea procese de inhibare.

ACCIDENTE SERICE

In urma injecţiilor cu ser heterolog se produc, la om în proporţii de 40—50%, şi mult mai rar la animale, accidente care, în marea majoritate a cazurilor, sînt lipsite de gravitate, mai ales dacă se iau precauţiile recomandate în acest caz. Aceste accidente pot fi imediate sau tardive. Cele imediate se produc la indivizii care au mai fost injectaţi cu acelaşi ser heterolog şi ele se încadrează, ca origine şi simptomatologie, în şocul anafilactic. Cele tardive, cunoscute sub numele de boala serului, se observă destul de frecvent la om; ele apar după 4—30 de zile de la injecţia serului, sînt

lipsite de gravitate şi se manifestă prin erupţii, de cele mai multe ori, de tip urticariform, dar pot fi şi de tip scarlatiniform sau morbiliform, limitate la locul de injecţie a serului (forma locală) sau răspîndite pe tot corpul (forma generalizată). Aceste manifestări cutanate care dau, uneori, un prurit viu pot fi însoţite, în cazurile grave, de reacţii generale ca febră, cefalee, tulburări gastrice (vărsături), dureri musculare şi articulare. În unele cazuri se pot observa contracţii musculare în general limitate la muşchii maseteri, care amintesc intoxicaţia tetanică. Boala serului poate prezenta şi unele complicaţii nervoase, cum este paralizia amiotrofică a membrelor superioare.

Accidentele imediate se produc scurt timp după injecţia serului şi sînt mai grave la persoanele care au fost injectate, cu 1—6 luni înainte, cu ser provenind de la aceeaşi specie. Uneori s-au observat reacţii imediate şi la persoane care se injectează pentru prima dată cu ser heterolog. În toate cazurile reacţia apare brusc şi se manifestă printr-un edem şi eritem local, însoţit de erupţia locală sau generală, edem al feţei şi al buzelor, pulsul foarte slab, dispnee gravă, însoţită de o expectoraţie de culoare albicioasă, care conţine mult aer. Bolnavul se remite, din această stare, aparent foarte gravă, destul de repede. Cazurile mortale, deşi foarte rare, nu lipsesc cu desăvîrşire. După unii autori accidente grave se produc la un individ din 20 000, iar mortale la unul din 50 000.

Accidentele serice imediate pot fi evitate. Se recomandă în acest scop, ca injectarea serului să se facă fracţionat şi foarte încet. Prima injecţie se face cu 0,25 ml de ser pur sau diluat cu apă fiziologică, a doua se face după 3 ore cu o cantitate mai mare de ser — 1 ml — iar, după alte 3 ore, dacă bolnavul a suportat bine primele două injecţii, se administrează toată cantitatea de ser necesară. Prin aceste injecţii fracţionate se realizează, aşa cum a arătat Besredka, o desensibilizare a organismului faţă de proteinele ce se găsesc în serul respectiv.

Adrenalina, prin acţiunea sa vasoconstrictoare, poate înlătura fenomenele serice imediate sau tardive.

Accidente serice imediate sau tardive s-au observat la unele animale — iepuri, viţei, păsări. Ele se traduc prin eriteme şi edeme locale trecătoare; se pot produce, însă, uneori, fenomene generale grave, urmate de moarte.

Toxicitatea serurilor sanguine. Serul unei specii animale poate produce tulburări anatomice şi fiziologice atunci cînd este injectat, pe cale parenterală, în organismul unei alte specii animale. Serul de bou, de exemplu, este toxic pentru cobai, şoarece, iepure etc. Intensitatea tulburărilor care urmează unei asemenea administrări este în relaţie cu:

— specia animalului de la care provine serul;
— specia animalului la care se administrează serul;
— calea de injecţie;
— doza.

Serul diverselor specii nu este egal de toxic. Serul animalelor inferioare — anghilă — este de 50 de ori mai toxic ca al celor superioare. Printre animalele superioare se constată, la fel, diferenţe importante în ceea ce priveşte toxicitatea serului lor sanguin. Serul de bou este mai toxic ca cel de cîine, cel de cîine mai toxic ca cel de cal. Serul păsărilor (găină, gîscă) este foarte toxic pentru iepure, ceea ce, în parte, pare a fi datorit şi hemolizinelor pe care el le conţine.

Scanned with OKEN Scanner

Animalele aparţinînd diverselor specii nu reacţionează în acelaşi fel faţă de un ser. Pentru cobai, serul de cal este lipsit de toxicitate (Bardach şi Goret, 1947), în timp ce pentru iepure el are un grad oarecare de nocivitate. Slătineanu şi Ciucă (1911) stabilesc că pentru iepure toxicitatea diverselor seruri, în ordinea descrescîndă, este următoarea : bou, cal, oaie, cîine, capră. Pentru cobai, serul de cîine este mult mai toxic ca cel de cal, dar pentru iepure, dimpotrivă, serul de cal este mai toxic decît cel de cîine.

Calea de injecţie influenţează tulburările consecutive administrării serului. Serul de cîine, pe cale intravenoasă şi în doză de 0,5 ml, omoară şoarecele în 30—40 de minute. Acelaşi ser, injectat tot la şoarece, în doză de 1—2 ml pe cale subcutanată sau intraperitoneală, nu produce tulburări manifeste. Tot serul de cîine omoară regulat şi în scurt timp, 1—30 de minute, cobaiul pe cale intravenoasă ; pe cale subcutanată, aceeaşi doză de ser sau chiar o doză de două ori mai mare produce edem şi escară locală, în general vindecabile. Calea cerebrală este foarte severă şi serurile injectate pe această cale produc constant moartea, chiar în doze mici (Besredka, 1907).

Serul de bou, administrat pe cale intradermică la cobai, produce edem şi escară locală în doză de 0,1 ml, cel de cîine provoacă, aceleaşi tulburări, în doza de 0,25 ml.

Doza mortală, pe cale intravenoasă, la cobai, variază în raport cu originea serului (Bardach şi Goret) aşa cum urmează :

Bou	0,5—1 ml
Iepure	5 ml
Cîine	5 ml

Serul de cal este suportat, pe cale intravenoasă, de cobai, în doza de 10 ml.

Serul de bou în doza de 0,5—1 ml omoară, pe cale intravenoasă, cobaiul, în cîteva ore ; dozele mai mari, 2—10 ml în cîteva minute sau chiar imediat, prin şoc.

Pe cale intraperitoneală şi tot pentru cobai, serul de bou este mortal în doza de 10 ml sau mai puţin, cel de cîine în doza tot de 10—20 ml. Serul de cal nu produce tulburări nici în doza de 20 ml.

Serul de bou injectat pe cale subcutanată la cobai, în doză de 1 ml, produce un edem trecător, uneori urmat de cianoză şi necroză umedă. Cianoza apare în prima zi după injecţie, iar escara a doua zi. Doza de 2 ml este urmată, regulat, de cianoză şi necroza umedă a pielii. Doza de 10 ml este urmată de reacţii locale şi generale, iar moartea survine la $^2/_3$ din animalele injectate. Doza de 20 ml, administrată tot pe cale subcutanată, omoară 80% din animalele injectate.

Serul de cîine administrat la cobai pe cale subcutanată, în doza de 7 ml, produce edem local care se vindecă, fără a produce necroza pielii. Doza de 10—20 ml este urmată de formaţia unui edem considerabil, însoţit de necroza umedă a pielii.

Pentru iepure, serul de cîine este puţin toxic. Doza de 50 ml de ser, injectată pe cale subcutanată, nu produce modificări locale. Această doză este perfect suportată pe cale intraperitoneală. Pe cale intravenoasă, iepurele suportă 10 ml de ser de cîine, dar este omorît de 30 ml.

Pe cale intracerebrală, iepurele suportă 1 ml de ser de cîine. Şoarecele nu este prea sensibil la acţiunea toxică a serului de cîine ; totuşi, pe cale intravenoasă, el este omorît, în 25—40 de minute, de o doză variind de la 0,5 la 1 ml, ceea ce reprezintă o doză enormă pentru acest animal pentru care chiar apa fiziologică este mortală pe cale intravenoasă în doza de 1 ml.

Serul de om este toxic pentru cobai şi, pe cale intravenoasă, doza de 1,5 ml produce tulburări mortale.

Detoxificarea serurilor. Folosirea serurilor imune, în prevenirea şi tratamentul infecţiilor microbiene, a pus problema detoxificării lor. Aceasta se obţine prin diverse metode. Invechirea, de exemplu, răpeşte parţial capacitatea toxică a unui ser (Besredka,

1907). Astfel, dacă serul de bou proaspăt în doza de 2 ml omoară cobaiul în 9 minute, în aceeaşi doză, acelaşi ser, este perfect suportat de animal după o conservare de 45 de zile. Atenuarea este însă numai parţială, căci 5 ml din serul conservat timp de 45 de zile omoară totuşi cobaiul pe cale intravenoasă. Aceleaşi rezultate se obţin printr-o încălzire de 2 ore la 56°C, ceea ce arată existenţa unor relaţii între conţinutul în alexină şi toxicitatea unui ser. Intr-adevăr, prin distrugerea alexinei se reduce toxicitatea serului.

Formolul, într-o concentraţie de 1/1 000, 1/2 000, 1/3 000, reduce toxicitatea unui ser proaspăt. Această reducere este în funcţie de concentraţia de formol şi timpul de contact. Concentraţia de 1/1 000 detoxifică un ser după 14 ore de contact la gheţar. Concentraţia de 1/2 000 realizează aceeaşi detoxificare după 57 de ore de contact.

După datele obţinute de B a r d a c h şi G o r e t, o detoxificare completă a unui ser de bou se obţine prin acţiunea combinată a căldurii, 37 sau 56°C, şi formolului. Un ser formolat 1/1 000 şi încălzit 2 ore la 56°C, precum şi un ser formolat 1/3 000 şi ţinut 13 ore la 37°C sînt suportate, pe cale intravenoasă, de cobai, chiar în doza de 10 ml, ceea ce arată că detoxificarea este practic totală.

Scanned with OKEN Scanner

ANTIGENUL ŞI ANTICORPUL

Cercetările experimentale, precum şi practica medicală şi veterinară au dovedit că un organism reacţionează cînd vine în contact cu un microb sau cu produsele sale de secreţie, şi că această reacţie se manifestă, printre altele, prin apariţia, în serul sanguin al organismului respectiv, a unor substanţe cu acţiune antimicrobiană sau antitoxică. Astfel, serul unui cal care a fost injectat, în repetate rînduri, de exemplu, cu bacilii rujetului, conţine substanţe care neutralizează activitatea nocivă a bacililor rujetului, deci conţine substanţe antirujetice. La fel, serul unui cal care a fost injectat cu toxina difterică conţine substanţe care neutralizează toxina difterică, deci substanţe antidifterice. In general, deci, un ser imun conţine substanţe anti faţă de produsul cu care organismul donator al serului a fost inoculat. Cercetarea mai îndeaproape a acestui interesant fenomen — unul din cele mai interesante din întreaga biologie — a arătat că nu numai microbii patogeni sau toxinele lor sînt capabile să dea naştere, în organism, la substanţe anti, dar chiar bacterii nepatogene, hematiile diverselor specii animale (B o r d e t, 1898), diverse materii proteice, adică elemente şi produse recunoscute ca lipsite de orice activitate patogenă, dau cînd sînt introduse în intimitatea ţesuturilor unui animal, substanţe anti, care se găsesc în serul sanguin al organismului inoculat.

In faţa acestor rezultate s-a simţit nevoia desemnării cu termeni unici, pe de o parte, a produsului inoculat şi capabil să provoace într-un organism substanţe anti, şi, pe de altă parte, a substanţei anti care ia naştere în organism sub influenţa unui produs inoculat. Elementele şi complecşii chimici care sînt apţi să producă substanţe anti au fost numiţi a n t i g e n i, iar substanţele anti au fost numite a n t i c o r p i. Să examinăm însuşirile fundamentale ale antigenului şi ale anticorpului.

ANTIGENUL

Se numeşte antigen orice element figurat sau substanţă chimică care produce anticorpi cînd este inoculat, pe cale parenterală, la un animal în organismul căruia nu se găseşte acel element sau acea substanţă chimică. Toate bacteriile sînt, în consecinţă, elemente figurate cu funcţiune antige-

nică pentru animale, pentru că ele nu fac parte din structura morfologică normală a animalelor. Globulele roşii de oaie au funcţiuni antigenice pentru iepure, pentru că ele nu se găsesc, ca atare, în organismul iepurelui. Iepurele are globule roşii, dar ele au, în raport cu hematiile de oaie, o altă compoziţie chimică. Hematiile unei oi nu sînt un antigen pentru altă oaie din cauză că toate oile au globule roşii de aceeaşi structură chimică. Serul sanguin al unei specii animale se comportă ca un antigen cînd este introdus în organismul altei specii animale, pentru motivul că compuşii chimici din serul sanguin al fiecărei specii sînt caracteristici.

Cuvîntul de antigen a fost folosit şi introdus în imunologie, în 1899, de Deutsch Ladislas, de la Facultatea de medicină din Budapesta, în timp ce lucra în laboratorul lui Mecinikov, la Paris.

CLASIFICAREA ANTIGENILOR

Antigenii pot fi clasificaţi din mai multe puncte de vedere. Astfel:

1. Priviţi din punct de vedere al originii lor, ei pot fi împărţiţi în:
   — antigeni naturali
   — antigeni artificiali
2. Priviţi din punct de vedere al capacităţii lor de a produce anticorpi şi de a reacţiona cu ei in vitro ei pot fi împărţiţi în:
   — antigeni completi
   — antigeni incompleţi, reziduali sau haptene.

ANTIGENII NATURALI

Antigenii naturali sînt acele complexe chimice care se găsesc, ca atare, în natură, adică în organismul diverselor plante sau animale. Complexele chimice din umorile organice sau din elementele figurate sînt antigeni naturali.

ANTIGENII ARTIFICIALI

Antigenii artificiali sînt, dimpotrivă, complexe chimice obţinute pe cale sintetică, în laborator. Cuplînd, de exemplu, atoxilul cu proteina serică de porc se obţine un antigen care nu există, sub această formă, în natură, deci un antigen nenatural, artificial. Studiul antigenilor artificiali, iniţiat de Landsteiner, a rezolvat multe probleme de imunologie practică şi teoretică.

ANTIGENII COMPLEŢI

Antigenii completi sînt reprezentaţi prin complexe chimice care injectate la un animal produc anticorpi şi reacţionează cu ei in vivo şi in vitro.

ANTIGENII INCOMPLEŢI

Antigenii incompleţi, reziduali sau haptenele sînt substanţe chimice, în general neproteice, desfăcute dintr-un antigen complet: substanţa des-

făcută a pierdut însuşirea de a provoca anticorpi, dar păstrează încă proprietatea de a reacţiona cu anticorpii care au luat naştere prin inocularea antigenului complet din care haptena s-a separat. Polizaharidele pneumococice, aşa cum au arătat Heidelberger şi Avery, se comportă, de exemplu, ca nişte haptene. Ele dau reacţii de seroprecipitare cu serul obţinut de la un animal inoculat cu suspensii de pneumococi, dar inoculaţi singuri nu produc anticorpi.

CONDIŢIILE ANTIGENITĂŢII

O substanţă chimică are şi îndeplineşte funcţiuni antigenice cînd :

1. este un complex chimic organic cu moleculă mare şi în stare coloidală ;
2. este inoculată pe cale parenterală la un animal în stare de echilibru fiziologic ;
3. este solubil în umorile organismului inoculat ;
4. nu există, ca atare, în ţesuturile organismului inoculat, cînd deci este eterogenă pentru specia organismului injectat.

Substanţele anorganice ca şi substanţele organice cu molecula mică — aminoacizii, alcoolii, monozaharidele — şi, în general, substanţele care dau soluţii adevărate nu sînt antigeni [1]. Există însă, pe de altă parte, şi substanţe proteice cu molecula mare, cum este, de exemplu, gelatina, care nu sînt totuşi antigeni [2]. Se poate spune, deci, că un antigen este o substanţă chimică complexă şi în stare coloidală, dar nu orice substanţă organică, în stare coloidală, este un antigen.

Substanţele antigenice nu pot, în general, funcţiona ca atare cînd sînt administrate per os, pentru motivul că în tubul digestiv ele sînt desfăcute, înainte de absorbţie, în compuşi chimici simpli care nu mai au însuşiri antigenice. Toxinele bacteriene ca toxina tetanică, de exemplu, sînt distruse de diversele elemente ale tubului digestiv (fermenţi ca ptialina şi pancreatina, flora bacteriană intestinală) şi introduse per os la animale ele dispar repede fără a produce anticorpi. (Carrière, 1899). În condiţii patologice antigenii pot, uneori, traversa bariera intestinală. Substanţele antigenice nu produc anticorpi decît în cazul cînd sînt inoculate parenteral, deci cînd

[1] Această concepţie clasică pare că nu corespunde întru totul realităţii. O serie de cercetători au arătat, în această privinţă, că, de exemplu, molecule neantigenice pot deveni anticorpogenetice atunci cînd sînt inoculate în organism împreună cu un gel de hidroxid de aluminiu. Pe de altă parte, Loiseleur (1950) afirmă că cele mai diverse molecule organice cu molecula mică, ca alcool etilic, diverşi pentaalcooli, hexozele etc. sînt antigenice dacă sînt solubile în apă la pH=7,4 şi dacă se inoculează la animale în doze mari şi repetate la scurt interval de timp, astfel ca să asigure, pentru un timp oarecare, o permanenţă a substanţei în organism. Anticorpii care iau naştere sub influenţa unor asemenea antigeni nu pot fi puşi, de regulă, în evidenţă prin tehnicile obişnuite şi se recurge, în scopul decelării lor în serul sanguin, la probe viscozimetrice, constatînd că viscozitatea creşte cînd se amestecă un asemenea ser cu substanţa respectivă. Reacţia de seroflocculare poate fi şi ea uneori pozitivă şi anume atunci cînd se foloseşte un antigen neproteic, dar cu o greutate moleculară ceva mai mare (rafinoza de exemplu).

[2] Faptul că gelatina nu poate funcţiona ca un antigen este în legătură cu o serie de proprietăţi ale sale ; astfel ea este un produs denaturat prin încălzire şi se elimină repede din organism ; în plus, structura sa chimică este lipsită de stabilitate datorită faptului că ea conţine o cantitate mare de glicină, care, neavînd lanţuri laterale în poziţia alfa, lanţurile peptidice în componenţa cărora intră glicina se pot roti libere în jurul axei lor lungi.

Scanned with OKEN Scanner

ajung pe căi naturale sau artificiale în intimitatea țesuturilor. Țesutul în care este introdus antigenul influențează cantitatea și calitatea anticorpilor a căror apariție o provoacă.

Antigenii care au fost făcuți insolubili prin acțiunea unor factori fizici sau chimici sînt inactivi și nu mai produc anticorpi.

La fel, substanța antigenică nu produce anticorpi cînd este injectată într-un organism în care substanța respectivă există. Globula roșie de oaie, de exemplu, nu este un antigen pentru oaie, dar este pentru iepure.

COMPOZIȚIA CHIMICĂ A ANTIGENILOR

Antigenii compleți sînt, în general, complecși coloidali de natură proteică. Afirmațiile făcute de unii cercetători cu privire la existența unor antigeni compleți, neproteici, nu au fost confirmate.

În structura chimică a antigenului se disting două grupe și anume:

1. Un suport coloidal, albuminic cu molecula mare și cu activitate nespecifică.

2. Un component cu molecula mică de natură proteică sau de altă natură, care imprimă antigenului caracterul de specificitate și care este numit, pentru acest motiv, factorul specificității sau gruparea determinată a antigenului. Existența acestor două grupe constituente ale antigenului se sprijină pe două serii de fapte: 1) izolarea grupării determinante de la unii antigeni; 2) includerea artificială în molecule proteice mari a unor grupări chimice simple sau crearea antigenilor artificiali.

Izolarea grupării determinante este posibilă în unele cazuri. Fierbînd, de exemplu, o cultură de bacili ai cărbunelui se obține o difuzare, în soluție, a unor principii chimici care dau reacții serologice cu un ser preparat cu cultură integrală de bacili ai cărbunelui, dar care nu mai produc anticorpi. Prin fierbere s-a produs separarea grupării active de suportul coloidal pe care era fixat în celula bacteriană și cu care constituia antigenul complet. La fel, din fracțiunea glucido-lipido-polipeptidică a bacteriilor Gram negative se poate separa fracțiunea glucidică, care reacționează specific cu anticorpii produși de complexul integral, dar care inoculată la animale nu mai produce anticorpi. Funcția glucidică, în acest caz, este factorul specificității, gruparea determinantă a antigenului complet, complexul glucido-lipido-polipeptidic. În fine, polizaharidul din capsula pneumococilor izolat și studiat de Heidelberger și colaboratorii (1923, 24, 25) este fracțiunea activă dintr-un complex chimic cu funcțiuni de antigen complet și care probabil că se găsește ca atare în celula pneumococului.

Posibilitatea creării antigenilor artificiali a arătat, încă și mai bine, funcțiunile și natura factorilor de specificitate dintr-un antigen. Primele cercetări în această privință au fost făcute de Obermayer și Pick (1906). Autorii, tratînd serul de cal cu acid azotic concentrat, obțin o xantoproteină care inoculată la iepure produce anticorpii ce nu mai reacționează decît slab sau de loc cu serul de cal, dar dau reacții evidente cu xantoproteina respectivă. Landsteiner (1919, 1920) a reușit de asemenea să creeze antigeni artificiali cuplînd substanțe simple, ca atoxilul, glucoza, acidul tartric, cu o proteină serică. El a constatat că proteina serică, prin această cuplare, își pierde specificitatea sa proprie, devine un alt antigen în care gruparea determinantă este tocmai substanța simplă intro-

Scanned with OKEN Scanner

dusă în molecula proteică. Antigenul astfel creat produce anticorpi care reacţionează în mod specific, atît cu antigenul inoculat cît şi cu orice complex proteic de altă natură în care s-a introdus gruparea determinantă. Proteina serică de porc, de exemplu, cuplată prin diazotare cu atoxilul, dă un antigen. Acest antigen inoculat la un animal produce anticorpi şi aceşti anticorpi reacţionează cu proteina serică de porc plus atoxil, dar şi cu albumina de ou plus atoxil etc. Atoxilul, în exemplul luat, imprimă specificitatea antigenului, în sensul că diversele substanţe proteice devin identice din punct de vedere antigenic atunci cînd se include în ele aceeaşi substanţă, aceeaşi grupare chimică.

Factorii de specificitate nu au putut fi izolaţi din toţi antigenii. Proteinele serice sînt antigeni, dar de la ele nu s-a izolat factorul de specificitate. Se admite totuşi că aceşti factori există şi ei sînt reprezentaţi prin grupele polare de aminoacizi care se găsesc la suprafaţa moleculei albuminice.

In concluzie, antigenii din punct de vedere chimic sînt molecule proteice, în stare coloidală, cuplate cu molecule simple de natură proteică sau de altă natură.

ACŢIUNEA FACTORILOR FIZICI ŞI CHIMICI ASUPRA ANTIGENILOR

Diverşi factori fizici sau chimici pot anula funcţiunile antigenice ale unor substanţe sau pot schimba natura antigenului. O albumină nativă, de exemplu, poate produce anticorpi care reacţionează cu ea însăşi, dar nu cu aceeaşi albumină denaturată prin încălzire şi invers. Exotoxinele bacteriene care sînt buni antigeni ca atare pierd această însuşire prin încălzire. Unii antigeni bacterieni şi în special haptenele bacteriene rezistă la încălziri prelungite la 100 sau chiar 120°C.

Substanţele chimice, în raport cu natura lor, au diferite acţiuni asupra antigenilor. Unii acizi puternici distrug antigenitatea unor substanţe. Dintre antiseptice, formolul are acţiunea cea mai interesantă ; el omoară germenii, anulează activitatea toxică a unor secreţii bacteriene, dar nu le anulează capacitatea lor antigenică. Exotoxinele, în special, îşi conservă în prezenţa formolului totala lor capacitate antigenică, deşi pierd întreaga lor toxicitate.

STRUCTURA ANTIGENICĂ A MICROBILOR

In mod curent, o suspensie de bacterii sau de virusuri este numită, în laboratoarele de imunologie, un antigen. Cînd se spune că un cal este injectat cu antigen cărbunos se înţelege că el este injectat cu o suspensie de bacili ai cărbunelui. Termenul este, în parte, impropriu, deoarece o suspensie de bacterie este constituită din celule bacteriene şi fiecare celulă nu conţine un singur antigen, ci mai mulţi. Cercetările făcute, în această privinţă, au arătat că o celulă bacteriană nu este un antigen ci, aşa cum s-a exprimat M. Nicolle, „un mozaic de antigeni". Această complexitate antigenică a fost pusă în evidenţă, în special, în cursul examenelor serologice făcute asupra bacteriilor din acelaşi grup. Fiecare specie la Salmonella, de exemplu, conţine antigeni comuni cu toate salmonelele, antigeni comuni cu anumite salmonele şi antigeni care îi sînt proprii. Ace-

laşi aspect îl întîlnim şi la colibacili. Structura antigenică a stafilococilor este şi ea foarte complicată şi fiecare tulpină are antigeni proprii şi antigeni comuni cu alte tulpini de stafilococi.

Ceea ce este valabil pentru bacterii este valabil şi pentru unele virusuri de dimensiuni mari. Virusul vaccinal conţine, după unii cercetători, cel puţin trei antigeni şi anume : un antigen S termostabil, un antigen L termolabil şi un antigen N P de natură nucleoproteidică. Rickettsiile conţin şi ele mai mulţi antigeni. Virusurile izomoleculare, cum sînt cele patogene pentru plante, este foarte probabil că sînt constituite dintr-un singur antigen.

STRUCTURA ANTIGENICĂ A ORGANISMELOR PLURICELULARE

Cercetările, sprijinite pe principiile şi metodele (reacţiile serologice) imunologiei, au arătat că diferenţele dintre specii nu sînt numai de ordin morfologic sau fiziologic, ci şi de ordin chimic. Fiecare specie se caracterizează, printre altele, şi prin aceea că pornind de la diverse materii prime fabrică substanţe care îi sînt proprii, caracteristice, specifice. Abateri de la această regulă generală nu lipsesc însă. Studiul diferenţierii speciilor prin mijloace serologice a arătat, într-adevăr, că speciile mult înrudite, prin caracterele lor morfologice, pot avea unii antigeni comuni. U h l e n h u t h, în acest sens, observă că serul iepurelui de cîmp conţine o materie antigenică comună cu a iepurelui de casă. Injectînd ser de iepure de casă la găină, autorul obţine un ser care precipită şi serul iepurelui de casă ca şi pe cel al iepurelui de cîmp. Dar serul iepurelui de casă conţine şi un antigen propriu. Un asemenea ser injectat la iepurele de cîmp va provoca apariţia anticorpilor precipitanţi activi, însă numai faţă de serul iepurelui de casă. Acelaşi autor a arătat că serul sanguin uman are un antigen comun cu serul maimuţelor superioare (cimpanzeu, gorilă, urangutan). Serul de cal are antigeni comuni cu serul de măgar sau catîr, serul de cîine cu serul de vulpe, serul de porc cu serul de mistreţ etc. Globulele roşii ale speciilor mult înrudite au şi ele antigeni comuni. Un ser hemolitic, activ faţă de globulele roşii de oaie, este hemolitic, în aceeaşi măsură, şi pentru globulele roşii de capră.

Unele organe au antigeni comuni cu organele similare aparţinînd uneori la specii mult îndepărtate. Un exemplu, în acest sens, îl constituie cristalinul. U h l e n h u t h a arătat că un ser precipitant obţinut pe iepure prin injectarea antigenului preparat din cristalinul de bou precipită antigenul cristalinian obţinut de la specii mult îndepărtate cum sînt omul, calul, porcul, cobaiul, păsările, broasca şi iepurele. S-a putut dovedi că cristalinul de la toate aceste animale conţine o substanţă de natură lipidică, care se comportă ca o haptenă şi care este precipitată de serul anticristalinian. Această haptenă formează cu o proteină caracteristică fiecărei specii antigenul complet al cristalinului.

ANTIGENII FORSSMAN

Speciile animale au antigeni comuni în unele organe care îndeplinesc funcţiuni identice la mai multe specii şi care nu iau parte activă în metabolismul organismelor. Cristalinul, unghiile, părul pot fi constituite, la

specii îndepărtate, din substanțe comune. Forssman, însă, a pus în evidență prezența unor antigeni comuni la specii mult îndepărtate și în organe care îndeplinesc funcțiuni esențiale în organism. Autorul, în 1911, obține un ser hemolitic pentru globulele roșii de oaie injectînd, la iepure, organe de cobai. Rezultate asemănătoare obține și prin injectarea organelor de cal sau pisică. Alți cercetători au pus în evidență substanțe, cu acțiune asemănătoare, la o serie întreagă de vertebrate ca leu, tigru, lup, vulpe, cîine, balenă, struț, găină, broască etc., precum și la unele bacterii ca *Bacillus anthracis* (Combiescu și col. 1930). La un număr important de specii se găsesc deci substanțe antigenice care, injectate la iepure sau la alt animal, lipsit de asemenea substanțe, provoacă apariția unor anticorpi care lizează globulele roșii de oaie. Aceste substanțe sînt cunoscute sub numele de antigenii lui Forssman și au fost îndeaproape studiate. S-a putut preciza, cu această ocazie, că ele sînt constituite din lipido-proteine. Fracțiunea lipidică se extrage din organe cu alcool și funcționează ca un factor determinant. Antigenul lui Forssman nu este uniform răspîndit în tot organismul: rinichiul pare a conține cantitățile cele mai importante, în timp ce în sînge nu se găsesc decît urme. Desigur că acești antigeni au ceva comun cu antigenii din globulele roșii de oaie: așa se explică hemoliza globulelor roșii de oaie sub influența unui ser provenind de la un animal care a fost injectat cu rinichi de cobai, precum și acțiunea toxică, pentru cobai, a serului de iepure injectat cu globule roșii de oaie. Nu există însă o identitate completă între antigenul globulelor de oaie și antigenii lui Forssman. Se constată, în acest sens, că un ser hemolitic preparat cu globule roșii de oaie este activ și față de globulele roșii de bou, în timp ce un ser hemolitic antioaie, rezultat din injecția antigenilor lui Forssman, este activ numai față de globulele de oaie. Deci, în globulele roșii de oaie există cel puțin doi antigeni capabili să provoace apariția anticorpilor hemolitici și anume unul este identic cu antigenii lui Forssman, iar altul cu o substanță din globulele roșii de bou. De altfel, materii antigenice capabile să provoace apariția hemolizinelor antioaie se găsesc și în corpul unor specii bacteriene. Salmonelele ca și bacilul dizenteriei Shiga conțin asemenea materii antigenice. Aceste substanțe însă nu sînt identice cu antigenii lui Forssman, căci hemolizinele dintr-un ser preparat cu antigenul lui Forssman nu sînt adsorbite de aceste substanțe microbiene. Mai mult încă, hemolizinele, apărute în urma injectării unei salmonele, nu sînt fixate de antigenii, cu aceeași acțiune, care se găsesc în soma bacilului dizenteriei. Rezultă, din aceste observații, multiplicitatea antigenilor care constituie globulele roșii.

GRUPELE SANGUINE

Specii animale sau vegetale îndepărtate pot avea antigenii comuni, dar se întîmplă și invers, ca în cadrul aceleiași specii să se găsească indivizi sau grupe de indivizi care diferă între ei prin structura lor antigenică.

La specia umană, de exemplu, serul unor indivizi aglutinează, în unele cazuri, globulele roșii ale altor indivizi. Prima observație, în acest sens, a fost făcută de Landsteiner, în 1900, și fenomenul, prezentînd o importanță practică și teoretică deosebită, a fost îndeaproape studiat, ajungîndu-se la o serie de constatări fundamentale și anume:

1. Serul sanguin uman poate conține două aglutinine sau izoaglutinine active față de globulele roșii umane. Aceste aglutinine sînt distincte una de alta și desemnate, convențional, cu literele a și b. Unii indivizi au, în serul lor, ambele aglutinine, alții numai pe una din ele și, în fine, alții au un ser lipsit de putere aglutinantă, deci lipsit de orice aglutinină.

2. Globulele roșii umane conțin, la rîndul lor, doi antigeni (aglutinogeni) corespunzători aglutininelor din ser și care au fost numiți, respectiv, A și B. Globulele roșii, posedînd aglutinogenul A, vor fi aglutinate de serurile cu aglutinina a, iar cele conținînd aglutinogenul B, de serul uman cu aglutinina b. Ținînd seama de prezența unui sau ambilor antigeni, precum și de absența oricărui antigen, oamenii au fost împărțiți în patru grupe numite O, A, B și AB.

Grupa O — posedă globule roșii fără nici un aglutinogen sensibil față de izoaglutininele a și b din serul uman. Serul sanguin conține aglutininele a și b.

Grupa A — posedă globule roșii avînd aglutinogenul A, fiind deci aglutinate de serul indivizilor care conțin aglutinina a. Nu conțin aglutinogenul B. Serul sanguin conține aglutinina b.

Grupa B — posedă globule roșii avînd aglutinogenul B, fiind deci aglutinate de aglutinina b. Nu conțin aglutinogenul B. Serul sanguin conține aglutinina a.

Grupa AB — posedă globule roșii avînd doi aglutinogeni A și B și fiind deci aglutinate de aglutininele a și b. Serul sanguin al persoanelor din această grupă nu conțin aglutinine a sau b.

3. Aglutininele se găsesc în ser, iar substanța fixatoare a anticorpului respectiv în globula roșie. Un individ nu poate avea aglutinina și aglutinogenul respectiv, de exemplu, aglutinina a în ser și aglutinogenul A în globule, fiindcă s-ar produce aglutinarea propriilor globule, fenomen incompatibil cu viața. Se constată, într-adevăr, că un individ din grupa A, a cărui globule conțin antigenul A, are în serul său aglutinina, anticorpul b. Un asemenea ser nu va aglutina globulele proprii, dar le va aglutina pe ale indivizilor din grupa B sau AB, deci globulele roșii care conțin aglutinogenul B. Tot așa indivizii din grupa B vor conține în serul lor aglutinina a activă față de globulele roșii ale indivizilor din grupa A și AB. Indivizii din grupa O, deci acei ale căror globule nu sînt aglutinate de nici un ser uman, au în serul lor ambele aglutinine a și b și deci manifestă o intensă putere aglutinantă. Absența aglutinogenului din globule atrage după sine prezența aglutininei în plasmă.

In tabelul 38, se arată care este conținutul în aglutinine și aglutinogen al sîngelui celor patru grupe umane.

Tabelul 38

Conținutul în aglutinine și aglutinogen al sîngelui celor patru grupe sanguine la om

Grupa sanguină	Aglutinogenul conținut de globulele roșii	Aglutininele conținute în plasmă
O	—	a și b
A	A	b
B	B	a
AB	AB	—

Descoperirea grupelor sanguine a găsit în biologie, în general, și în medicină, în special, o serie de aplicații privind originea raselor umane, evitarea accidentelor în caz de transfuzii sanguine, cercetarea paternității etc. S-a putut constata că diversele grupuri sanguine nu sînt uniform răspîndite pe pămînt. Astfel, la popoarele occidentale

predomină grupele O și A; în țările orientale apar din ce în ce mai frecvent indivizi aparținînd grupei B, în detrimentul grupei A. Ungurii, deși așezați în centrul Europei, păstrează, prin prezența grupei B, pecetea originii lor răsăritene. La germanii amestecați cu slavi grupul B este mai des întîlnit ca la cei ce nu au suferit asemenea amestec. Aceste constatări ne arată că factorii care determină grupul sanguin al unui individ sînt strîns legați de ereditatea lui și că prin schimbarea poziției geografice pe care o ocupă un popor, nu se schimbă grupa căreia indivizii acestui popor aparțin.

Determinarea grupului sanguin este necesară, în special, în caz de transfuzii și ea se face atît la omul ce primește (receptor), cît și la cel ce dă sîngele (donator). In absența acestei cercetări se pot produce accidente. Să presupunem, într-adevăr, că un bolnav, care are nevoie de o transfuzie, aparține grupului A, conține deci antigenul A și aglutinina b; dacă i se injectează sînge de la un individ care aparține grupei B, atunci plasma bolnavului va aglutina globulele roșii introduse; pachetele de globule, astfel formate, vor obstrua vasele sanguine, producîndu-se, din această cauză, tulburări grave. Bineînțeles că plasma introdusă, o dată cu globulele roșii, de la individul din grupa B, conține deci aglutinina a, va aglutina globulele roșii ale bolnavului. Tulburările datorite acestui proces sînt puțin manifeste și, practic, nu prezintă nici o importanță, pentru motivul că plasma introdusă este în mică cantitate în raport cu masa de globule roșii pe care o posedă bolnavul. Din punct de vedere practic, este important ca globulele roșii introduse să nu fie aglutinate de plasma primitorului.

Examinînd tabelul 38, putem observa că anumiți indivizi, anume cei din grupa AB, pot primi sînge de la orice individ. Plasma oamenilor din acest grup, fiind lipsită de izoaglutinine, nu va putea aglutina globulele roșii umane. Acești indivizi pot primi sînge de la orice individ. In schimb, persoanele care aparțin grupei O nu pot primi sînge decît de la persoane din aceeași grupă, deoarece plasma indivizilor din această grupă va aglutina globulele roșii ale persoanelor din grupele A și B sau AB. Globulele roșii ale oamenilor din grupa O, fiind lipsite de orice aglutinogen, pot fi însă injectate la orice persoană. Indivizii din această grupă au fost numiți, pentru acest motiv, donatori universali.

Pentru a determina grupa căruia aparține un individ sînt necesare două seruri izoaglutinante și anume un ser care conține aglutinina a — provine de la indivizi din grupa B — și altul care conține aglutinina b. In vederea examenului se recoltează, de la persoane ale căror grupă sanguină trebuie cercetată, două picături de sînge din pulpa degetului. Aceste picături se pun pe o lamă curată. In una din picături se pune un ser și în a doua celălalt ser. Ce se poate obține?

a) Aglutinarea nu se produce în nici o picătură, persoana aparținînd, în acest caz, grupei O, căci globulele sale roșii sînt fără nici un izoaglutinogen. Nefiind aglutinate de nici o plasmă, ele pot fi injectate la orice persoană.

b) Aglutinarea se produce într-o singură picătură și individul aparține grupei A sau grupei B. Aparține grupei A dacă globulele roșii au fost aglutinate de serul provenind de la un individ din grupa B și invers.

c) Aglutinarea se produce în ambele picături și persoana aparține, în acest caz, grupei AB. Ea poate primi de la orice persoană (primitor universal), dar nu poate da decît la persoanele care aparțin aceleiași grupe.

Cercetarea grupei sanguine se poate face și prin metoda aglutinării lente. In acest scop, se repartizează în cîteva tuburi, doze crescînde de ser (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ml etc.) și un volum egal sau dublu de suspensie de globule roșii în apă fiziologică (2,5 ml de globule roșii, sedimentate prin centrifugare pentru 100 ml de apă fiziologică). Citirea se face după 12—24 de ore, la termostat sau la temperatura camerei. Proba este

Scanned with OKEN Scanner

negativă cînd sedimentul se omogenizează perfect şi cu uşurinţă şi este pozitivă cînd depozitul nu se omogenizează perfect chiar printr-o agitare energică.

Cercetările ulterioare au pus în evidenţă, în constituţia antigenică a globulelor roşii umane, prezenţa a altor două aglutinogene de grupă, denumite M şi N, precum şi a factorului Rh. Globulele roşii ale unui individ pot conţine fie antigenul M, fie antigenul N, fie pe amîndoi. Spre deosebire de ceea ce se întîmplă cu factorii A şi B, antigenilor M şi N nu le corespund izoaglutinine, adică un individ care are factorul M nu are, în acelaşi timp, şi aglutinina anti N. Prezenţa acestor antigeni nu o putem pune deci în evidenţă decît injectînd la iepure globule roşii umane — de preferinţă de la indivizi din grupa O, lipsiţi de antigenul A şi B. In acest caz, alături de anticorpi aglutinanţi activi faţă de globulele roşii ale speciei umane, indiferent de grupă, vor apărea şi aglutinine M pentru globulele care conţin antigenul M sau aglutinina N pentru cele care conţin antigenul N. Pentru a debarasa un astfel de ser de aglutinina speciei şi a păstra aglutinina de grupă, recurgem la metoda adsorbţiei. In acest scop, serul unui iepure imunizat cu globulele roşii ale unui om din grupa M este pus în contact cu globulele roşii ale unui om care aparţine grupei N. Aceste globule vor fixa toate aglutininele produse de globulele roşii umane, dar nu vor avea o acţiune asemănătoare faţă de aglutininele anti M pentru motivul că ele nu posedă antigenul corespunzător. Un asemenea ser, obţinut după eliminarea globulelor roşii va aglutina numai globulele roşii aparţinînd indivizilor din grupa M. In acelaş mod se procedează pentru a obţine un ser anti N.

Factorul Rh a fost descoperit de Landsteiner şi Wiener (1940). Autorii, imunizînd iepurii cu globulele roşii de maimuţă *(Maccacus rhesus)*, au observat că serul obţinut aglutinează globulele roşii ale unor oameni. Aceşti oameni au deci în globulele lor roşii un factor antigenic comun cu maimuţa, factor care a fost numit Rh. Acest antigen Rh, spre deosebire de ceilalţi antigeni din globulele roşii umane, poate produce anticorpi chiar la om. Astfel, o femeie însărcinată (şi care nu conţine factorul Rh) se poate imuniza şi poate fabrica anticorpi Rh în cazul cînd embrionul conţine, în globulele sale roşii, antigenul respectiv moştenit de la tată. O asemenea femeie, care conţine anticorpi Rh, poate prezenta complicaţii după transfuzii, în cazul folosirii unui sînge cu antigen Rh. De asemenea anticorpii Rh pot apărea şi în urma transfuziilor făcute cu un sînge care conţine antigen Rh. Prezenţa anticorpilor Rh în sîngele matern ar fi, după Levine şi colaboratorii, cauza eritroblastozei fetale.

Dintre animale, maimuţele superioare au, în serul lor, izoaglutinine, iar globulele roşii conţin izoaglutinogene, comparabile cu cele ce se găsesc la indivizii speciei umane. Mai mult încă, factorii care se găsesc la om se întîlnesc şi la aceste animale. Cimpanzeii aparţin grupei O sau A, plasma lor aglutinînd globulele roşii ale indivizilor din grupa B. La urangutani şi giboni se găsesc toate cele patru grupe ale speciei umane, O, A, B şi AB.

La cal, unii cercetători disting mai multe grupe sanguine. Dujaric de la Rivière şi Kossowitch disting patru grupe, iar Schermer şi Hofferber, citaţi de Wirth (1931), cinci. Concentraţia izoaglutininelor în plasma cailor din diverse grupe este redusă şi de aceea transfuzia sanguină se poate face, fără pericol, de la orice donator la orice acceptor (Eyquem şi Poliachouk, 1952, 1953).

La bovidee, Ottenberg şi Friedmann au găsit trei grupe sanguine; la oaie, Bialosuknia şi Kacznovski, tot trei (vezi şi Dujaric de la Rivière şi col. 1952); la porci, Szymanovski şi colaboratorii, Berezy, trei; la păsări, Karshner, trei.

La cîine şi pisică, diverşi cercetători au pus în evidenţă procese de izoaglutinare, dar nu s-a precizat încă numărul grupelor sanguine existente la aceste două specii de carnasiere. La iepure, datele obţinute sînt contradictorii.

La şobolanii albi, Friedberger şi Taslakova nu au putut pune în evidenţă existenţa mai multor grupe sanguine, dar la şobolanii sălbatici, aceiaşi autori identifică patru grupe. La capră, nu s-au observat fenomene de izoaglutinare (vezi Wirth, 1931).

ANTICORPUL

Anticorpul este un produs de reacţie al unui organism faţă de un antigen. Proprietatea esenţială a anticorpului o constituie capacitatea sa de a se cupla numai cu antigenul care i-a dat naştere. Această cuplare este deci specifică şi duce, în general, la modificarea proprietăţilor fizice, chimice sau biologice ale antigenului. Modificarea antigenului prin anticorp se soldează, uneori, prin neutralizarea activităţii nocive a antigenilor microbieni — toxine sau germeni — ceea ce constituie una din funcţiunile principale ale anticorpilor, şi pe această funcţiune se sprijină seroprevenţia şi seroterapia.

CLASIFICAREA ANTICORPILOR

Anticorpii, priviţi din punct de vedere al originii lor, pot fi împărţiţi în două grupe şi anume:

— anticorpi naturali sau normali;
— anticorpi accidentali.

ANTICORPII NATURALI

Anticorpii naturali sau normali sînt acei cu care un organism se naşte. Astfel, după cum am văzut la studiul grupelor sanguine sînt indivizi din specia umană care conţin anticorpi faţă de globulele roşii ale altor indivizi din aceeaşi specie. Anticorpii (aglutininele) a şi b din plasma sanguină a grupelor A şi B se mai numesc şi *izoanticorpi* sau *izoaglutinine* pentru că sînt activi pentru globulele roşii ale unor indivizi de aceeaşi specie. Există însă şi heteroanticorpi sau heteroaglutinine naturale. Astfel, serul de găină conţine aglutinine pentru globulele roşii de iepure, deci aglutinine pentru globulele roşii ale altei specii. Anticorpii hemoaglutinanţi din serul de găină sînt tot naturali pentru că îi găsim la toate găinile şi nu au apărut prin contactul unui organism cu antigenul.

ANTICORPII ACCIDENTALI

Anticorpii accidentali sau artificiali sînt acei care se găsesc în serul sanguin al unui organism care a venit în contact cu un antigen. Spre deosebire de anticorpii naturali, cei artificiali nu se găsesc la toţi indivizii unei specii, ci numai la unii din ei şi anume la acei care, accidental, au

venit în contact cu antigenul. Anticorpii care se nasc într-un organism prin contactul cu antigenul se mai numesc şi imunoanticorpi.

Unii imunoanticorpi sînt foarte răspîndiţi printre indivizii unei specii. Astfel, serul sanguin de la numeroase bovine conţine antitoxine tetanice, cel de la numeroase cabaline conţine antitoxine difterice, cel de la porc aglutinine antisalmonelice etc. Prezenţa acestor imunoanticorpi, la un număr mare de indivizi dintr-o specie, este legată de răspîndirea antigenilor respectivi în natură. Astfel, bacilul tetanosului se găseşte frecvent în tubul digestiv al bovinelor unde probabil se înmulţeşte şi produce toxina ; aceasta din urmă, ajungînd în circulaţia generală, provoacă apariţia anticorpilor. La fel, salmonelele forţează frecvent barierele organice şi ajung, în special, în ganglionii mezenterici, ceea ce duce la apariţia anticorpilor. Anticorpii naturali ca şi anticorpii accidentali au afinitate pentru antigen şi se cuplează cu el. Se admite însă că anticorpii accidentali au o afinitate mai mare pentru antigen şi o specificitate mai însemnată.

COMPOZIŢIA CHIMICĂ A ANTICORPILOR

Anticorpii sînt de natură proteică. Această afirmaţie se sprijină pe constatarea că un ser imun pierde acest atribut atunci cînd este supus acţiunii unor factori care, în general, modifică starea fizico-chimică a proteinelor. Astfel, Silber şi Demidova (1932) au arătat că un ser imun se inactivează prin căldură, adică prin coagularea proteinelor sale. In acelaşi sens, se constată că enzimele proteolitice (pepsina) inactivează anticorpii şi că substanţele chimice care se combină cu proteinele, formolul de exemplu, duc, la fel, la dispariţia anticorpilor şi a activităţii specifice a unui ser. Natura albuminică mai reiese şi din constatarea că la animalele hrănite cu alimente sărace în albumine producţia de anticorpi este redusă în raport cu producţia de la animalele hrănite cu un exces de albumine.

Aceste date au dovedit că anticorpii se comportă ca toate proteinele. Ne putem întreba acuma dacă anticorpii din serul sanguin reprezintă o proteină nouă, inexistentă înainte de imunizare sau ei fac parte constituentă din albuminele preexistente sau în fine sînt chiar una din proteinele existente.

Tabelul 39

Conţinutul plasmei (serului) diferitelor specii animale în diverse proteine antigenice (Determinare electroforetică) (după Doerr, 1948)

Specia animală	Materialul	Fibrinogen	Albumine	Globuline total	Globulina α	Globulina β	Globulina γ
		In procente faţă de protenia totală					
Om_1	Ser	—	70[1]	29,8	5,3	9,8	14,7
Om_2	Ser	—	66	34	7	14	13
Om_3	Plasmă	6	62	32	7	13	12
Bou	Plasmă	18	40	42	16	8	18
Cal	Ser	—	42	58	13	21	24
$Iepure_3$	Ser	—	76	24,1	1,1	10,8	12,2
$Iepure_4$	Ser	—	64[3]	35,7	—	15,0	20,7

Anticorpii nu sînt o proteină nouă, nu sînt nici o fracţiune din seroalbuminele normale, ci ei fac parte integrantă din seroglobuline. Cercetările făcute în această privinţă au arătat, într-adevăr, că în ceea ce priveşte seroalbuminele nu există diferenţe între serul normal şi serul imun. În schimb, un ser normal spre deosebire de un ser imun conţine mai puţine globuline. O serie de cercetători, printre care Ionescu Mihăeşti şi colaboratorii (1935), au arătat, de exemplu, că în cursul hiperimunizării cailor cu toxine bacteriene (difterică sau tetanică) se produce un dezechilibru proteic al serului sanguin şi anume, seroglobulinele cresc, iar seroalbuminele scad. Date asemănătoare obţine şi Wehmayer (1948) la bovine imunizate cu vaccin antiaftos ; în acest caz, proteinemia totală, controlată electroforetic, creşte de la 0,35 la 0,78 şi creşterea se face pe socoteala globulinelor, seroalbuminele suferind, dimpotrivă, o uşoară scădere. Argumente în favoarea naturii globulinice a anticorpilor se găsesc şi în faptul că anticorpii precipită o dată cu globulinele în soluţii semisaturate de sulfat de amoniu sau în soluţii 20—22% de sulfat de sodiu anhidru. Electroforetic, anticorpii se separă, la fel, o dată cu globulinele. Reiese din aceste date că anticorpii sînt înglobaţi în fracţiunea globulinică a proteinelor serice. O dată acest fapt stabilit, s-a încercat, pe de o parte, identificarea fracţiunilor globulinice care constituie anticorpul, iar, pe de altă parte, purificarea proteinei anticorp. Identificarea fracţiunilor globulinice care constituie anticorpul a fost făcută atît pe cale fizică cît şi prin mijloace chimice. Astfel, electroforeza (Tiselius, 1937) permite să se identifice în serul sanguin trei fracţiuni globulinice, numite alfa, beta şi gama. Anticorpii se găsesc în fracţiunea gama. O experienţă simplă a dovedit acest lucru. Un iepure imunizat cu albumina de ou produce anticorpi faţă de această albumină ; punînd în contact serul sanguin al iepurelui astfel imunizat cu albumina de ou se va produce cuplarea antigenului cu anticorpul, precipitarea complexului şi deci dispariţia anticorpului din soluţia de ser imun. Supunînd această soluţie examenului electroforetic se constată că ea nu mai conţine sau conţine cantităţi mult reduse de globuline gama. Dispariţia sau reducerea cantităţii de globuline gama în aceste condiţii nu poate fi datorită decît adsorbţiei lor pe antigen. Cercetările făcute după acest model experimental au arătat că în general un ser imun nu pierde prin contactul cu antigenul decît o parte din globulinele sale gama, ceea ce este în legătură cu faptul că nu toate globulinele gama capătă, în cursul imunizării, proprietăţi de anticorp. Există deci în organism, chiar în cazul celei mai prelungite şi mai severe metode de imunizare, grupe de celule care fabrică globuline gama normale. Antigenul nu poate, după cît se pare, bloca toate celulele anticorpoformatoare, impunîndu-le să producă globuline gama cu funcţiuni de anticorp. Proporţia de globuline gama care se transformă sub influenţa antigenului în anticorpi variază în raport cu antigenul, cu căile de inoculare, cu specia animalului etc. Cercetările lui Tiselius şi Kabat au mai arătat că la unele specii animale, globulinele anticorp se situează, în diagrama electroforetică, între globulinele beta şi gama, constituind aşa-numita componentă T, care este prezentă numai în serurile imune. În unele cazuri, anticorpii sînt repartizaţi între fracţiunile gama şi T, iar în altele chiar fracţiunile globulinice beta pot căpăta funcţiuni de anticorp.

Scanned with OKEN Scanner

Sandor (1949), printre alţii, a examinat diverse seruri în scopul de a determina repartizarea anticorpilor în diferitele fracţiuni globulinice (euglobulina I, euglobulina II A, euglobulina II B, pseudoglobulina şi fracţiunea rezistentă a lui Pope) izolate prin diverse metode. El constată că anticorpii antibacterieni lipsesc cu desăvîrşire în fracţiunea lui Pope, dar se găsesc în marea lor majoritate în euglobulina I şi într-o mai mică măsură în celelalte fracţiuni globulinice, în timp ce antitoxinele din serul antiveninos, antidifteric, antitetanic se găsesc în fracţiunea lui Pope şi pseudoglobuline, dar lipsesc cu desăvîrşire în celelalte fracţiuni globulinice.

Diversele globuline din serurile imune se izolează astfel:

a) *Euglobulina I* precipită prin dializa serului faţă de apă distilată timp de 12—18 ore, deci prin eliminarea sărurilor.

b) *Euglobulina II A.* După separarea euglobulinei I se diluează serul cu apă distilată şi se ajustează pH-ul amestecului la cifra 6,2. In aceste condiţii euglobulina II A precipită.

c) *Euglobulina II B.* Lichidul de la b se duce la pH = 5,4 cînd euglobulina II B precipită.

d) *Pseudoglobulina.* Se neutralizează lichidele din care s-au separat celelalte fracţiuni şi apoi se precipită pseudoglobulinele cu sulfat de amoniu 34%.

e) *Fracţiunea rezistentă a lui Pope.* La 50 ml ser se adaugă:

— 25 ml dintr-un tampon acetat N/10 la pH = 4.

— 0,500 g de pepsină titrînd 500 şi dizolvată într-un volum potrivit de apă.

— Un amestec de acid clorhidric şi apă în aşa fel ca pH-ul să fie egal cu 4, iar volumul lichidului să fie de 150 ml. Se lasă, pentru digestie, timp de 30 de minute, la 37—38°C şi apoi se adaugă 18 g de sulfat de amoniu, 0,250 g de pepsină, titrînd 500. Amestecul se încălzeşte 1 oră la 58°C. Coagulul format se elimină prin centrifugare. Apa de deasupra este neutralizată şi globulinele sînt precipitate prin adăugare de sulfat de amoniu 18%. Precipitatul este luat cu apă distilată. Se elimină un coagul abundent şi soluţia este făcută izotonică.

Cercetările privind purificarea anticorpilor au confirmat natura lor globulinică şi au completat cunoaşterea acestor substanţe. Purificarea s-a făcut prin diverse procedee — precipitare cu alcool 10% la temperaturi mai mici ca 4°C, adsorbţii nespecifice pe caolin sau specifice pe antigenii respectivi şi eluarea respectivă, digestie triptică la pH = 3,7 şi precipitări cu sulfat de amoniu etc. Aceste metode au permis izolarea unor anticorpi într-o stare vecină cu puritatea absolută. Anticorpul antitoxic difteric a fost obţinut; de exemplu, sub formă de proteină cristalizată; cristalele nu-şi pierd activitatea prin solubilizări şi precipitări repetate. Ele sînt constituite, în mare parte, din anticorpi, căci precipită cu antigenul respectiv în proporţie de 90%.

Greutatea moleculară şi dimensiunile anticorpului sînt echivalente cu ale globulinei normale a speciei animale respective. Cum aceste constante fizice ale globulinelor serice variază de la o specie animală la alta, înseamnă că şi constantele fizice ale moleculei anticorp vor varia în aceeaşi măsură. Astfel, globulina anticorp antipneumococică de cal are o greutate moleculară de 930 000 şi dimensiunile medii de 80 milimicroni, iar globulina antipneumococică (anticorp) de iepure are greutatea moleculară de 157 000, iar dimensiunile ceva mai mari de 11 milimicroni. Identitatea dintre globulina serică şi globulina anticorp reiese şi din faptul că acelaşi antigen provoacă anticorpi de dimensiuni diferite, la specii de animale diferite. Acelaşi antigen pneumococic va produce la iepure anticorpi de 11 milimicroni, iar la cal de 80 milimicroni.

Scanned with OKEN Scanner

Incercări numeroase făcute în scopul de a izola din globulina anticorp un grup prostetic, neproteic şi activ au dat rezultate negative.

In concluzie, anticorpii sînt reprezentaţi în organism prin unele fracţiuni globulinice normale care, sintetizîndu-se în prezenţa antigenului, capătă proprietăţi de anticorp. Funcţiunea de anticorp este legată de globulin aserică şi anume de globulina gama care are cea mai mare greutate moleculară şi în acelaşi timp cea mai slabă energie potenţială.

LOCUL DE FORMARE A ANTICORPILOR IN ORGANISM

Anticorpii iau naştere numai în cazul cînd o substanţă antigenică solubilă pătrunde în intimitatea ţesuturilor unui organism. De regulă, organismul fabrică anticorpii sub influenţa şi în contact cu antigenul. O excepţie de la această regulă ar constitui-o, după unii autori, anticorpii normali şi anume izoaglutininele din serurile sanguine umane. Aceşti anticorpi nu se găsesc însă în sîngele fetal, ceea ce a determinat pe alţi cercetători să admită că chiar şi izoaglutininele s-ar forma postnatal, sub influenţa unor antigeni bacterieni sau de altă natură. Ne putem întreba acum dacă toate ţesuturile organismului fabrică anticorpi sau sînt în organism anumite ţesuturi care au această funcţiune?

E h r l i c h, formulînd teoria lanţurilor laterale cu privire la geneza anticorpilor, admitea că celulele receptive fabrică anticorpii. In consecinţă, celulele nervoase ale animalelor receptive fabrică anticorpii faţă de antigenii neurotropi, celulele dermice faţă de cei dermotropi etc. A fost uşor să se demonstreze, experimental (M e c i n i k o v şi M a r i e), că realitatea era alta şi că celulele nervoase, de exemplu, nu produc anticorpi faţă de toxina tetanică sau faţă de virusul rabic şi nici celulele dermice faţă de virusurile variolice. Injectîndu-se, de exemplu, un antigen neurotrop în creier, s-a putut observa că anticorpii apar întîi în sînge şi apoi în lichidul cefalorahidian. Lucrurile s-ar petrece invers dacă anticorpii ar fi fabricaţi exclusiv de celulele nervoase. Pe de altă parte, inocularea antigenilor marcaţi (antigeni cu iod radioactiv, de exemplu) a arătat că aceşti antigeni se fixează şi se găsesc în celulele sistemului reticuloendotelial şi în special în citoplasma macrofagelor. Faptele care infirmă teoria lui E h r l i c h constituie însă argumente în favoarea tezei după care anticorpii nu sînt fabricaţi de celulele receptive faţă de antigen, ci de anumite celule din organism (M e c i n i k o v, P f e i f f e r şi M a r x, 1890, 1898 şi alţii). Unele fapte experimentale arată, în această privinţă, că sistemul reticuloendotelial are un rol important, dacă nu exclusiv, în fabricarea anticorpilor. In acest sens, se constată, în primul rînd, că injecţia antigenului, la unele animale, este urmată de o hipertrofie a organelor bogate în ţesut reticuloendotelial şi anume mărirea splinei şi ganglionilor limfatici şi de apariţia, în sînge, a plasmocitelor şi a mononuclearelor mari, nemature. In acelaşi sens, s-a observat că la animalele fără splină (splenectomizate) sau la care sistemul reticuloendotelial este blocat prin diverse substanţe, producerea de anticorpi este redusă în comparaţie cu un animal normal. Efectul splenectomiei asupra producerii de anticorpi este important cînd operaţia s-a făcut înainte sau în primele 4 zile după injectarea antigenului. Făcută în a 6-a zi ea este fără influenţă, ceea ce dovedeşte că după acest interval de timp nu mai ia parte la formarea anticorpilor. Un rol însemnat în fabricarea anticorpilor îl au, pe lîngă splină, ganglionii limfatici.

Scanned with OKEN Scanner

La iepurii injectaţi intraplantar cu un antigen se constată, în zilele urmînd injecţiei, o hipertrofie a centrilor germinativi din ganglionii limfatici aferenţi şi o dublare a conţinutului lor în acid ribonucleic. Or, aşa cum au arătat cercetările recente, acest din urmă acid însoţeşte procesele de sinteză proteinică în organism. Prezenţa sa denotă deci că în ganglioni are loc o fabricaţie intensă de proteine, probabil proteine anticorp.

Celulele reticuloendoteliale din meninge ca şi elementele gliale din creier au, după Z d r o d o v s k i, un rol important în fabricarea anticorpilor.

Locul de formare a anticorpilor este condiţionat şi de calea de administrare a antigenului. Astfel, administrarea subcutanată este urmată de captarea antigenilor de către ganglionii limfatici şi de o fabricare de anticorpi în ganglionii respectivi. În urma administrării intravenoase, antigenul este captat, în mare parte, în splină şi, în consecinţă, anticorpii se fabrică, în cea mai mare parte, în acest organ. La animalele splenectomizate, slaba producere de anticorpi se observă, într-adevăr, atunci cînd antigenul este injectat intravenos, dar nu cînd este administrat pe cale intraperitoneală sau direct în vena portă, cînd el ajunge deci întîi în ficat. Reiese din aceste date că şi ficatul este un activ anticorpoformator. Anticorpii, după unii autori, s-ar putea forma şi în plasma sanguină, antigenul putînd conferi însuşiri de anticorpi globulinelor plasmatice cu care vine în contact în torentul circulator. Aceste cercetări nu au fost însă confirmate. Folosindu-se antigeni cu ioni de I sau As marcaţi, s-a constatat, de asemenea, că aceşti antigeni dispar repede din sînge, dar se găsesc în diverse ţesuturi sau organe şi bogăţia lor în antigen nu este legată de volumul de sînge pe care organele îl conţin, ci de cantitatea de ţesut reticuloendotelial. Astfel, ficatul, măduva osoasă acumulează cantităţi importante de antigen (H a u r o w i t z şi B r e i n l, 1932).

În concluzie, anticorpii sînt reprezentaţi, în organism, prin însăşi seroglobulinele organice; ei sînt seroglobuline organice cu proprietăţi speciale. Aceste proprietăţi speciale decurg din faptul că ele se sintetizează sub influenţa antigenului. Anticorpii sînt deci globuline modificate în aşa fel încît ele pot îndeplini, pe lîngă funcţiunile lor obişnuite, funcţiuni noi, de apărare. Anticorpii reprezintă rezultatul unui răspuns adaptativ la noi condiţii de mediu.

Producţia de anticorpi necesită un anumit material plastic şi în special anumiţi aminoacizi. Dintre aminoacizi, rolul cel mai important în fabricarea anticorpilor îl au triptofanul şi metionina. În consecinţă, o alimentaţie săracă, în general, în proteine influenţează producerea de anticorpi şi anume reduce această producere.

MECANISMUL FORMĂRII ANTICORPILOR

După ce am arătat care sînt proprietăţile fizico-chimice şi locul de formare a anticorpilor în organism, să vedem care este mecanismul formării anticorpilor, în ce mod determină antigenul formarea într-un organism a unor seroglobuline care au drept caracteristică fundamentală însuşirea de a se cupla cu antigenul care a prezidat apariţia lor. Îndată ce noţiunea de anticorp a fost definită, aceste întrebări au şi fost puse de diverşi biologi care au formulat, pentru a răspunde la ele, diverse teorii.

Scanned with OKEN Scanner

Teoria originii antigenice a anticorpului formulată de Buchner, în 1890, susține că anticorpul este antigenul modificat. Această ipoteză, susținută și de alți cercetători moderni, a fost infirmată de o serie de date experimentale. Astfel, s-a dovedit că nu există o concordanță între cantitatea de antigen inoculată unui animal și cantitatea de anticorpi ce a luat naștere, că uneori cantități infime de antigen produc cantități foarte mari de anticorpi. Experimentîndu-se cu toxina difterică purificată, s-a putut stabili, de exemplu, că o moleculă de toxină produce 50 000 de molecule de antitoxină. În plus, și ceea ce este încă mai convingător, s-a mai constatat că unele elemente care sînt incluse în gruparea determinantă a unor antigeni artificiali nu se găsesc în anticorpi. Astfel, antigenul artificial, rezultat din cuplarea atoxilului cu o proteină, și care conține arsenic, produce, în organism, un anticorp care nu conține arsenic.

Teoria lanțurilor laterale, este formulată de Ehrlich în anii 1899—1900, pentru a explica atît mecanismul formării anticorpilor cît și natura specificității reacțiilor dintre antigen și anticorp.

Acest autor reduce procesul de fabricație a anticorpilor la un fenomen de nutriție celulară. Celulele din organism, spune el, se nutresc fixînd din umori alimentele necesare. Fixarea se datorește unei afinități chimice dintre celulă și aliment. Grupul celular care fixează un aliment poartă, în teoria lui Ehrlich, numele de receptor. Unele celule posedă receptori față de anumite toxine, receptori toxofili. Existența acestor receptori explică, după autor, pătrunderea și fixarea toxinelor și a tuturor antigenilor pe anumite celule.

Înglobarea unui antigen în anumite celule se datorește faptului că la rîndul lui antigenul are afinitate pentru celulă, posedă o grupare numită haptofor prin intermediul căreia se fixează pe receptorul celular. Pe lîngă haptofor, toxina posedă însă și o grupare toxică, numită toxofor. Prin grupul haptofor, toxoforul este introdus în interiorul celulelor unde exercită efectul nociv. Dacă cantitatea de toxină fixată de celulă este importantă, aceasta este distrusă. Dacă, dimpotrivă, cantitatea înglobată de o celulă nu produce efecte iremediabile, aceasta își reia compoziția normală și fabrică noi receptori cu funcțiuni nutritive identice celor blocate de toxină. Această fabricație însă depășește necesitățile celulei și excesul de receptori, cu afinitate pentru toxina în cauză, se varsă în sînge, constituind, în cazul luat drept exemplu, antitoxinele bacteriene. Teoria încearcă să explice astfel nu numai modul de formare al anticorpilor, dar și cauza specificității lor. Într-adevăr, spune Ehrlich, receptorii care se refac în celula intoxicată vor fi tocmai cei blocați de toxină, cei care, datorită afinității lor pentru toxină, s-au unit cu ea. Afinitatea receptorilor pentru toxina respectivă se manifestă nu numai în interiorul celulei, ci și în umori și de aici activitatea antitoxică a umorilor unui organism imunizat.

Teoria lui Ehrlich a cunoscut o mare celebritate, dar faptele nu au confirmat-o. Astfel, conform acestei teorii, celulele sensibile față de o toxină sau un virus ar fi cele care ar produce și anticorpii respectivi. Or, s-a putut constata că nu așa se petrec lucrurile în realitate. Astfel, organismul găinii este refractar față de toxina tetanică, ceea ce înseamnă că toxina nu se fixează pe celula nervoasă, cu toate acestea el produce antitoxina respectivă. De asemenea, conform ipotezei lui Ehrlich ar trebui ca într-o celulă să existe atîția receptori cîți antigeni există în natură. Ori, cum aceștia

Scanned with OKEN Scanner

din urmă sînt în număr infinit, este greu de imaginat că celulele ar putea poseda un număr echivalent de receptori.

Teoria impresiunilor a fost formulată de Gamaleia tot pentru a explica mecanismul formării anticorpilor. După autor, receptorii celulari nu preexistă în organism, ci iau naştere sub influenţa antigenului. „Antigenii — scrie el — acţionînd asupra celulelor, provoacă în celule unele modificări care au o structură identică cu aceştia, însă contrarie. Antigenul trecînd prin celulă lasă o amprentă identică cu aceea pe care o pecete o imprimă pe ceară roşie. Dacă, ulterior, celula începe să elimine aceste amprente, ele evident vor avea o afinitate specifică pentru antigenul care le-a produs. Fiind un mulaj fidel al antigenului, aceste amprente sînt legate în modul cel mai strîns de acest antigen (Gamaleia, citat de Silber)".

Teoria fizico-chimică. Identificarea anticorpilor cu globulinele serice a permis lui Breinl şi Haurowitz (1930), precum şi lui Pauling (1940—1946), Bresler şi Talmud (1944) să formuleze o ipoteză care este în concordanţă cu cunoştinţele actuale privind natura anticorpilor şi structura moleculelor proteinice. Într-adevăr, anticorpii, conform datelor actuale, fac parte integrantă din globulinele serice, sînt globuline modificate. Ei se formează deci în locul şi în condiţiile în care se sintetizează globulinele normale. Modificările pe care le prezintă globulina anticorp, în raport cu globulina normală, sînt datorite faptului că sinteza globulinei anticorp se face în prezenţa antigenului. Această prezenţă tulbură normala aranjare şi cuplare a aminoacizilor, care constituie globulina anticorp, în aşa fel încît unele grupări polare rămîn periferice şi cu afinitate pentru antigen. Globulina anticorp, care se naşte în prezenţa antigenului, păstrează amprenta, pecetea antigenului. În această parte, ipoteza fizico-chimică a autorilor citaţi se apropie de teoria lui Gamaleia.

Teoria fizico-chimică şi-a găsit o confirmare în experienţele lui Pauling şi Campbell (1942). Autorii au reuşit să transforme, in vitro, globulina normală în globulină anticorp. În acest scop ei au supus globuline normale (globulina gama) acţiunii denaturante a unor factori fizici, temperatura de 57°C, sau chimici (alcali) în prezenţa antigenilor. În aceste condiţii, în special într-un mediu alcalin, pH = 11, globulina denaturată ia configuraţia structurii antigenului. Globulina anticorp astfel obţinută reacţionează, în mod specific, cu antigenul sub influenţa căruia a luat naştere.

Experienţele lui Pauling şi Campbell cu privire la crearea anticorpilor artificiali au fost, în parte, confirmate de Kuzin şi Nevraeva care reuşesc să obţină anticorpi artificiali faţă de un antigen complex de natură microbiană, cuplat cu albastru de metilen. Folosind alte haptene decît albastrul de metilen, autorii nu au mai obţinut rezultatele pozitive.

Loiseleur (1950), folosind ca antigeni substanţe organice cu moleculă mică ca xiloză, arabinoză, rafinoză, alcool, streptomicină etc., reuşeşte să creeze globuline cu funcţiuni de anticorp in vitro. In acest scop, amestecul de globulină gama (albuminele serice şi nici celelalte fracţiuni globulinice nu dau rezultate) şi antigen se supune unei uşoare alcalinizări (pH = 8) şi acţiunii unor factori mecanici (ultrasunetele, agitaţia într-un omogenizator). Anticorpul obţinut este specific. Autorul, de acord cu Pauling, admite că sub influenţa factorilor citaţi mai sus lanţul polipeptidic al moleculelor de globuline gama se desface, capetele sale rămînînd libere şi susceptibile de a se adapta la antigen.

Scanned with OKEN Scanner

In teoria fizico-chimică a formării anticorpilor mai există încă lucruri necunoscute, dar în faza actuală a cunoştinţelor noastre ea apare ca cea mai logică.

VITEZA ŞI DURATA FORMĂRII ANTICORPILOR

Timpul necesar formării anticorpilor nu a putut fi cu precizie stabilit din cauză că lipesc metode precise pentru descoperirea lor. Folosindu-se metode viscozimetrice, s-a putut totuşi constata că, în unele cazuri, viscozitatea serului sanguin se modifică în prezenţa antigenului chiar după 4 ore de la injecţia animalului cu antigenul respectiv. Pe de altă parte, s-a dovedit că iepurii prezintă o rezistenţă crescută faţă de infecţia pneumococică chiar după 2 zile de la vaccinare. Aceste date arată că anticorpii circulanţi apar scurt timp după administrarea antigenului. Ei ating o concentraţie maximă şi apoi conţinutul lor scade pînă la dispariţie. În timpul prezenţei lor în sînge, anticorpii se elimină prin urină, salivă şi materii fecale. Antitoxine difterice au fost găsite, de exemplu, în urina cailor hiperimunizaţi. În unele cazuri, se constată o persistenţă prelungită a anticorpilor în sînge. Oamenii care au răspuns, printr-o producţie de anticorpi, la o injecţie de polizaharide pneumococice, pot să conţină anticorpii respectivi chiar după cîţiva ani de la injecţia antigenului.

PRODUCEREA DE ANTICORPI ŞI SISTEMUL NERVOS

Anticorpii iau naştere în organism printr-un mecanism fiziologic — mecanismul de formare a globulinelor — şi, în consecinţă, producţia de anticorpi se supune legilor fiziologice generale, se încadrează în aceste legi. Primatul sistemului nervos, rolul său conducător în toate reacţiile organice, constituie una din legile fiziologice generale şi ea se aplică tuturor proceselor de imunitate, în general, şi producţiei anticorpilor, în special (Schambouroff şi col. 1936, Zernoff, 1937 etc.). Rolul sistemului nervos în procesul de fabricare a anticorpilor reiese, în primul rînd, din constatarea că există o legătură strînsă între gradul de dezvoltare a sistemului nervos şi capacitatea de producţie a anticorpilor. Animalele inferioare, cu un sistem nervos puţin dezvoltat, sînt, într-adevăr, puţin apte producţiei de anticorpi. La peşti se pot, de exemplu, forma unii anticorpi, însă o dezvoltare mare a funcţiunilor anticorpoformatoare o găsim la mamifere, adică la metazoarele cu cel mai dezvoltat sistem nervos.

In acelaşi sens, se constată că, în general, inocularea antigenului direct în sistemul nervos duce la o producţie mult mai mare de anticorpi decît inocularea sa pe alte căi. Nikolaeva (1940) observă, de exemplu, că, la iepure, aceeaşi cantitate de anatoxină tetanică produce, pe cale subcutanată, 0,5 U.A. (unităţi antitoxice) pe 1 ml, iar pe cale subarahnoidiană 1 U.A. Revaccinarea aceloraşi animale, pe aceleaşi căi, dă rezultate încă şi mai nete şi anume: la animalul vaccinat şi revaccinat pe cale subcutanată se produc 2 U.A., iar la animalul vaccinat şi revaccinat pe cale subarahnoidiană se produc 8—9 U.A. Kravcenko şi Vajdanova (1946) observă, în acelaşi sens, că inocularea intracerebrală a unui antigen salmonelic este urmată de o producţie de anticorpi de 15 ori mai mare ca inocularea aceleiaşi cantităţi de antigen pe cale subcutanată. Ponomarev (1927) constată că iepurii nu se imunizează faţă de infecţia cărbunoasă cu vaccin Ţen-

kovski I, administrat pe cale subcutanată, dar se imunizează cînd același vaccin este introdus pe cale intracerebrală. Terentiev și Stefanova (1946) reușesc să producă o imunitate anticărbunoasă pe cale intracerebrală cu vaccin Țenkovski I sau cu vaccin mort. Isopescu și Cormuș (1950), folosind tulpini edematogene — acapsulogene de cărbune, constată că aceste tulpini, în doză de 0,25 ml de cultură în bulion de 24 de ore, diluată 1/10 și chiar 1/100, imunizează iepurii în proporție de 66%, pe cale intracerebrală; doze de 80—100 de ori mai mari imunizează numai 25% din iepuri, pe cale subcutanată, iar pe cale intraperitoneală doze de 400—4 000 de ori mai mari imunizează 20—30% din iepuri. Contactul antigenului cu sistemul nervos asigură, după aceste date, instalarea unei imunități solide. In același sens, trebuie interpretate și constatările, făcute de Terentiev și Stefanova, după care o inoculare subcutanată de antigen poate fi activă din punct de vedere imunizant dacă antigenul este asociat cu o substanță care permeabilizează bariera hematoencefalică, permițînd vehicularea și contactul sistemului nervos cu antigenul. O asemenea substanță permeabilizantă este saponina și vaccinurile anticărbunoase cu saponină sînt active, după autori, tocmai pentru că substanța adjuvantă permite excitarea sistemului nervos de către antigen.

Tot ca un fapt care sprijină rolul sistemului nervos în formarea anticorpilor, îl constituie constatarea că la animalele anesteziate, deci la care excitabilitatea sistemului nervos este abolită, producția de anticorpi față de un antigen dat este redusă sau nulă (Strighin, 1953, Ghermanov, 1953 etc.). Dimpotrivă, excitarea sistemului nervos duce la o îmbogățire a sîngelui în anticorpi. Benetato (1950) observă, în acest sens, că la animalele imune excitarea faradică a centrilor hipotalamici este însoțită de o creștere a anticorpilor în sîngele circulant. Benetato (1946) a arătat că la animalele la care s-a secționat măduva cervicală nu are loc o reacție de imunitate; dimpotrivă, această reacție apare într-un organism care nu mai are nici o legătură vasculară cu organismul, dar păstrează legăturile nervoase (experiența cu capul izolat); în aceste condiții o excitație antigenică a creierului duce la apariția anticorpilor în sîngele circulant. In acest sens, amintim că Lopașov (1950) apără teza după care anticorpii se produc pe cale reflexă fără un contact al antigenului cu organele fabricatoare. Excitînd hemoreceptorii ganglionului carotidian, Gordienko obține, la animalele normale, o creștere a titrului de anticorpi normali din sîngele circulant. Ado (1952) afirmă că pe cale reflexă se poate, prin receptorii vaselor, ridica nivelul tensiunii proceselor de producere a globulinelor anticorp, probabil modificînd troficitatea mezenchimului anticorpoformator, atestînd astfel necesitatea contactului dintre antigen și țesutul anticorpoformator.

Sistemul nervos vegetativ și mediatorii săi chimici influențează producția de anticorpi într-un sens sau altul. Cercetări, care demonstrează acest lucru, au fost făcute de Belak (1925—1939) în Ungaria, de Golodeț și Pucikov (1939) Klimentova (1948) și alții în U.R.S.S. Aceste cercetări au stabilit, în primul rînd, că parasimpaticul stimulează producția de anticorpi, iar simpaticul o inhibează. In consecință, substanțele parasimpaticotrope (pilocarpina, de exemplu) măresc producția de anticorpi (antitoxina difterică, aglutinine, hemolizine), iar substanțele simpaticotrope (atropina sau epinefrina) inhibă producția de anticorpi. Stepanova

Scanned with OKEN Scanner

(1949) constată, în această privință, că iepurii imunizați nu mai rezistă la infecția de control dacă sînt injectați, în prealabil, cu atropină, 1 ml dintr-o soluție 1%. Mediatorii chimici măresc sau reduc producția de anticorpi, după cum ei sînt puși în libertate de parasimpatic sau simpatic. Astfel, acetilcolina de origine parasimpatică produce la animalele deja imunizate o reacție anamnetică, adică o creștere a titrului de anticorpi circulanți, iar adrenalina, de origine simpatică, reduce acest titru. Acetilcolina, injectată paralel cu antigenul, duce la o creștere remarcabilă a titrului de anticorpi.

Aceste date dovedesc că sistemul nervos are un rol esențial în producerea anticorpilor și, în general, în instalarea unei stări de imunitate. Ne putem întreba, împreună cu Zdrodovski, care este explicația faptului că, de exemplu, un antigen inoculat direct în sistemul nervos duce la o producție mai mare de anticorpi și la instalarea unei imunități mai solide decît injectarea sa pe alte căi. Acest fapt se datorește unei activități mult sporite a elementelor reticuloendoteliale din țesutul nervos sau intervenției directe a sistemului nervos? Un răspuns la această întrebare încă nu poate fi dat, dar unele fapte experimentale arată că în procesul de asimilare a antigenului de către celule și de producere a anticorpilor de către aceste celule, pe lîngă fenomenul fizico-chimic de absorbție și digestie există și un mecanism nervos. Procesul fizico-chimic este influențat de fluxul nervos și cu cît impulsul nervos este mai puternic cu atît și procesul fizico-chimic evoluează în condiții mai bune. Am putea compara mecanismul de producere a anticorpilor cu mecanismul digestiei. Digestia se face în condiții cu atît mai bune și cu un randament cu atît mai mare cu cît sistemul nervos se găsește într-o stare de reactivitate mai însemnată și, dimpotrivă, ea se face greu și cu randament slab cînd sistemul nervos este obosit și impulsurile sale asupra organelor de digestie sînt de mică intensitate. Sistemul nervos influențează, așa cum afirmă Ado, troficitatea mezenchimului, ridică activitatea sa trofică și deci și capacitatea sa de a provoca anticorpi.

Unii cercetători, Metalnikof și Sorin (1927), au surprins apariția unor reacții de imunitate în condițiile reflexelor condiționate. Introducînd, de exemplu, un antigen (bacili antracoizi) în cavitatea peritoneală a cobaiului și însoțind această introducere de un excitant condiționat (aplicarea pe abdomen a unei plăci metalice încălzite la 50°C), autorii obțin, după repetarea, de mai multe ori, a operației, apariția reacției peritoneale (exudat și leucocite) numai prin excitantul condițional, fără introducerea antigenului. Alți cercetători ca Ostrovskaia (1929), Zeitlenok (1929) și alții au arătat că chiar unii anticorpi, ca aglutininele de exemplu, pot apărea pe calea reflexelor condiționate. Reacțiile anamnetice (de aducere aminte) au la bază, după cît se pare, un mecanism reflex. Reacția anamnetică constă în producerea unor anticorpi pe care un organism i-a fabricat o dată, sub influența unui antigen, dar, de data aceasta, fără intervenția antigenului respectiv. Un iepure, de exemplu, imunizat o dată cu salmonele produce anticorpi salmonelici cînd i se injectează, de exemplu, lapte. Gordienko (1949) obține o creștere a titrului anticorpilor aglutinanți la animale imune printr-o excitație dureroasă, provocată printr-un curent electric. Același cercetător observă că starea de agitație, care urmează injectării unui antigen sau care apare în perioada de descreștere a titrului anticorpilor din sînge, duce la o creștere a anticorpilor circulanți.

Scanned with OKEN Scanner

Hormonii influenţează producerea anticorpilor, precum şi procesele de imunitate. În condiţii experimentale s-a stabilit că administrarea hormonului adenocorticotrop şi a cortizonului reduce cantitatea de anticorpi antipneumococici din sîngele circulant al iepurilor imunizaţi. La fel, s-a observat că extirparea hipofizei duce la atrofia splinei şi consecutiv la scăderea capacităţii de producţie a anticorpilor. Cercetările lui Ado şi colaboratorii (1952) au dovedit că antigenii, excitînd hemoreceptorii zonelor vasculare reflexogene, produc modificări circulatorii, respiratorii şi secretorii. În ceea ce priveşte modificările secretorii, s-a demonstrat că secreţia adrenalinei se produce în cazul excitării hemoreceptorilor ganglionului carotidian cu antigen dizenteric. Or, se ştie, că hiperadrenalinemia organică este un factor care înlesneşte, într-o oarecare măsură, procesele de fagocitoză. Rezultă din aceste date atît modul cum diverşi hormoni influenţează fenomenele de imunitate, cum şi mecanismul intim al intervenţiei sistemului nervos în aceste fenomene.

Procesele imunologice se supun legilor fiziologice generale şi deci şi legii excitaţiei şi inhibiţiei. In această privinţă se constată că o stare de excitaţie provocată de un antigen este urmată de o fază de inhibiţie, o fază în care un organism nu mai răspunde la antigen. Este necesar un timp oarecare pentru ca această fază de inhibiţie să fie depăşită, organismul recîştigîndu-şi excitabilitatea normală şi, adeseori, chiar o creştere a excitabilităţii imunologice normale. În consecinţă, injectarea unui vaccin (antigen) produce o stare de inhibiţie şi de aceea în zilele imediat următoare o nouă administrare de antigen este inactivă din punct de vedere al producţiei de anticorpi. În cazul însă cînd injecţia a doua se face după ce faza de inhibiţie a trecut, asistăm la un răspuns mult mai energic ca acel care a fost dat la prima injecţie, tocmai din cauza creşterii reactivităţii organice. Aceste date dovedesc, pe de o parte, importanţa revaccinărilor în crearea stărilor de imunitate, iar pe de altă parte, însemnătatea duratei de timp care separă vaccinarea de revaccinare. În prepararea serurilor imune, durata dintre injecţii trebuie stabilită cu foarte multă precauţie pentru fiecare antigen şi chiar pentru fiecare animal. Nerespectarea legii intervalelor poate duce la rezultate contrarii celor scontate şi explică, în parte, de ce, în aceleaşi condiţii, unele animale dau un ser mai bun ca altele. Starea de inhibiţie faţă de antigen se poate observa şi în cazul cînd se administrează, simultan, la acelaşi organism, doi antigeni diferiţi, unul în cantitate mare, altul în cantitate mai mică. In aceste condiţii se observă că organismul produce anticorpi numai faţă de unul din antigeni şi anume faţă de cel care are o putere iritativă mai mare pentru organism. In tehnica preparării serurilor imune trebuie să se ţină seama, aşa cum afirmă Zdrodovski, de trei legi şi anume: legea sumaţiei (aceeaşi cantitate de antigen produce mai mulţi anticorpi cînd este inoculată în mai multe reprize decît atunci cînd este inoculată într-o singură repriză), legea intervalelor şi legea excitaţiei şi inhibiţiei.

Scanned with OKEN Scanner

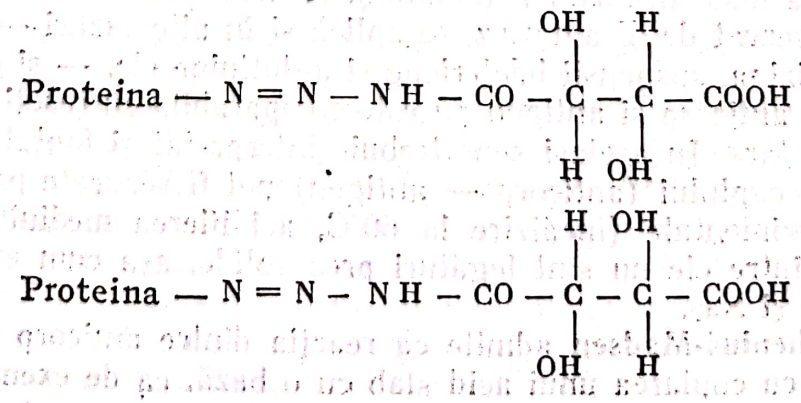
REACȚIILE DINTRE ANTIGEN ȘI ANTICORP

SPECIFICITATEA REACȚIILOR DINTRE ANTIGEN ȘI ANTICORP

Anticorpul are afinitate pentru antigen și anume pentru antigenul sub a cărui influență și în a cărui prezență a luat naștere. Această afinitate a anticorpului numai pentru antigenul care l-a generat constituie o lege care reglează relațiile dintre anticorp și antigen și anume legea specificității.

Existența și valabilitatea specificității au fost verificate în cursul a numeroase cercetări. Astfel, s-a demonstrat de exemplu că anticorpul care a luat naștere, în organismul iepurelui, în urma injecției globulelor roșii de oaie, va aglutina și hemoliza numai globulele roșii de oaie. La fel, anticorpul care a luat naștere, în organismul unui animal, în urma injecției toxinei tetanice, va neutraliza numai toxina tetanică; nici o altă otravă bacteriană, vegetală sau animală nu va fi inactivată de un asemenea anticorp. Specificitatea reacțiilor dintre anticorp și antigen ne dovedește că organismul fabrică pentru fiecare antigen un anticorp propriu, ne arată că organismul distinge diverși complecși antigenici și fabrică pentru fiecare complex un anumit anticorp. Această capacitate de distincție a fost și mai evident demonstrată în cursul studiilor făcute asupra antigenilor artificiali (Landsteiner, 1946).

Astfel, în condiții de laborator s-a putut cupla, pe aceeași proteină, pe de o parte acidul tartric levogir, iar pe de altă parte acidul tartric dextrogir, după formula:



Cele două substanțe, astfel obținute, se comportă ca doi antigeni diferiți. Astfel, injectîndu-le la iepuri diferiți, s-au obținut două seruri specifice și anume serul provenind de la iepurii injectați cu proteina cuplată cu acidul tartric dextrogir a precipitat numai această substanță, dar nu a precipitat proteina cuplată cu acidul tartric levogir. La fel, proteina cuplată cu acidul tartric levogir a dat și ea un ser specific. În același sens, s-a putut observa că o proteină cuplată cu glucoza diferă antigenic de aceeași proteină cuplată cu galactoza, deși cele două hexoze au aceeași formulă brută $C_6H_{12}O_6$.

Afinitatea specifică dintre antigen și anticorp mai rezultă, pe de altă parte, din constatarea că un antigen nu fixează dintr-un ser care conține mai mulți anticorpi decît pe acel care îi este propriu. Pe această însușire se bazează absorbția unor anticorpi dintr-un ser imun, adică epuizarea unui ser imun de anumiți anticorpi. Astfel, de exemplu, dacă un ser aglutinant conține mai mulți anticorpi și anume A, B și C activi față de trei specii bacteriene diferite și anume speciile a, b și c, prin contactul serului imun respectiv cu speciile b, c se elimină din ser anticorpii B și C, iar serul va fi activ și va aglutina numai specia a. Un asemenea ser poate fi folosit pentru diagnosticul speciei bacteriene a, el avînd o activitate specifică. Ori de cîte ori o cultură va fi aglutinată de serul astfel purificat, cultura va aparține speciei a. În consecință, dacă un anticorp nu apare decît în contact cu antigenul și dacă anticorpul se cuplează numai cu antigenul său, înseamnă că ori de cîte ori se vor găsi anticorpi pentru un antigen, în serul sanguin al unui organism, acel organism a fost sau este în contact cu antigeunl respectiv — toxină, bacterie, virus etc. Pe această constatare se sprijină diagnosticul speciilor microbiene și infecțiilor microbiene prin reacții serologice.

EXPLICAREA CUPLĂRII SPECIFICE A ANTICORPULUI CU ANTIGENUL

În diversele faze de dezvoltare a imunologiei, diverși cercetători au emis variate teorii în scopul de a explica legea specificității.

Teoria lui Ehrlich admite că reacțiile dintre anticorp și antigen sînt de natură chimică și comparabilă cu cele care au loc între un acid și o bază tare.

O serie de constatări contrazic această teorie. Astfel, s-a observat că neutralizarea unei toxine nu se face totdeauna cu aceeași cantitate de antitoxină. Cantitatea de antitoxină este mai mare cînd cele două elemente se amestecă în același timp și mai mică în cazul cînd se adaugă aceeași cantitate de antitoxină însă în doze fracționate și la diverse intervale de timp. Acest fenomen observat de D a n y s z se aplică și în alte cazuri — globulele roșii și hemolizina, suspensii bacteriene și aglutinine etc. — și el arată că cuplarea dintre anticorp și antigen nu este comparabilă cu reacția dintre un acid și o bază tare. În același sens trebuie interpretat și faptul că cele două elemente ale cuplului (anticorp — antigen) pot fi separate prin anumite artificii experimentale (încălzire la 60°C, acidifierea mediului etc.), ceea ce arată că între ele nu sînt legături prea solide, așa cum există de exemplu între SO_4 și Na_2.

Teoria lui Arhenius-Madsen admite că reacția dintre anticorp și antigen este similară cu cuplarea unui acid slab cu o bază, ca de exemplu cu-

plarea acidului boric cu amoniacul. Unele observaţii privind cuplarea anticorpului cu antigenul puteau fi explicate prin această concepţie, altele însă nu, ceea ce însemna că teoria nu corespundea realităţii, ducînd astfel la părăsirea ei.

Teoria lui Bordet. Bordet (1900, 1903) admite că procesul cuplării antigenului cu anticorpul, petrecîndu-se între doi coloizi, este asemănător tuturor proceselor care se întîmplă la acest tip de organizare a materiei. Dispariţia anticorpului dintr-o soluţie nu este rezultatul cuplării sale chimice cu antigenul, ci cel al unor fenomene de adsorbţie. Afirmaţia se sprijinea, în special, pe constatarea că neutralizarea unei toxine, de exemplu, poate fi făcută prin cantităţi variabile de anticorpi. Cuplarea antigenului cu anticorpul nu urmează deci legea raporturilor proporţionale, care este valabilă pentru combinaţiile care au loc, de exemplu, între un acid şi o bază. O anumită cantitate de acid sulfuric neutralizează totdeauna aceeaşi cantitate de hidrat de sodiu. În cazul neutralizării antigenilor (toxinelor) se pot obţine efecte egale cu cantităţi diferite de anticorpi, tocmai din cauză că procesul neutralizării nu se face pe baza legii raporturilor proporţionale, ci pe baza adsorbţiei coloidale. Un antigen poate adsorbi pe suprafaţa sa o cantitate variabilă de anticorpi, uneori mai mare decît este necesar neutralizării sale. În acelaşi sens se observă că într-un amestec de toxină şi antitoxină neinactivat, adică încă capabil să producă efecte patogene, nu se găseşte toxină liberă şi toxină neutralizată, după cum într-un amestec cu exces de antitoxină nu se găsesc antitoxine libere. Aceste date arată că posibilitatea unui antigen de a fixa anticorpii variază de la un caz la altul. În cazul amestecului neinactivat, anticorpii au fost adsorbiţi de particulele de antigen, dar ei fiind puţini s-au răspîndit pe toate suprafeţele de adsorbţie în doze mici şi deci incapabile să realizeze neutralizarea. În cazul unui exces de anticorpi, aceştia nu sînt liberi din cauză că s-au fixat pe suprafaţa antigenului în cantităţi care depăşesc necesităţile neutralizării.

Teoria lui Bordet, după datele adunate în literatura de specialitate de la formularea ei şi pînă astăzi, nu explică toate laturile fenomenului. Ea nu explică, de exemplu, marea specificitate a reacţiei dintre antigen şi anticorp, specificitate ce există în cazul cuplării antigenului cu anticorpul, dar care nu se întîlneşte în fenomenele de adsorbţie.

Teoria coeziunii. Kuzin (1946), folosind datele recente din literatură cu privire la condiţiile cuplării dintre antigenii purificaţi şi anticorpii respectivi, admite că la baza unirii dintre anticorp şi antigen stă fenomenul de coeziune. Ipoteza se sprijină atît pe modul de producere al anticorpilor cît şi pe structura chimică a anticorpilor şi antigenilor. Anticorpii, într-adevăr, sînt globuline normale modificate prin faptul că ele s-au construit în prezenţa antigenului. Modificarea constă în aceea că globulinele anticorp, spre deosebire de globulinele normale, au la suprafaţa lor grupe polare care formează figuri în mozaic echivalente cu cele ce se găsesc pe suprafaţa antigenului. Datorită desenului celor două feluri de molecule, ele se combină de îndată ce se întîlnesc. Kuzin socoteşte reală presupunerea după care combinarea antigenului cu anticorpul se datoreşte forţelor intramoleculare, cîmpului electric care se formează în jurul grupării determinante. Fenomenul ar fi comparabil cu tipul cunoscut în chimie al formării racematelor parţiale.

Scanned with OKEN Scanner

MODIFICĂRI SUFERITE DE ANTIGENI ÎN PREZENȚA ANTICORPILOR

S-a arătat, mai sus, că anticorpul are o afinitate remarcabilă pentru antigenul care i-a dat naștere și, din cauza acestei afinități, cele două complexe se cuplează ori de cîte ori se găsesc împreună în același mediu lichid. Cuplarea anticorpului cu antigenul duce la constituirea unui complex cu însușiri noi și diferite atît de antigen cît și de anticorp. Se întîmplă în acest caz ceea ce se observă în general în chimie ca și în alte domenii, că din cuplarea a două substanțe diferite sau identice (polimerizarea) rezultă un complex nou și diferit de ambele substanțe care l-au format. Astfel, cuplarea CO_2 cu apă dă aldehida formică; din polimerizarea aldehidei formice rezultă glicerina, iar două molecule de glicerină dau glucoza. Între aldehida formică și glucoză există diferențe însemnate: una este un toxic, alta este un aliment. Același fenomen general se întîmplă și în cazul cuplării antigenului cu anticorpul. Complexul rezultat din cele două elemente are însușiri noi. Ilustrarea acestei afirmații o găsim, în special, în însușirea pe care o are complexul antigen-anticorp de a fixa alexina, însușire pe care nu o are nici antigenul singur, nici anticorpul singur.

Antigenul și anticorpul se comportă deci, în complex, altfel decît fiecare element izolat și este de presupus că ambii constituenți suferă modificări mai mult sau mai puțin profunde prin intrarea lor în complexul antigen-anticorp. Modificările anticorpului au fost mai puțin urmărite, ele interesînd mai puțin practica, în schimb cele suferite de antigen au constituit obiectul de studiu a extrem de numeroase cercetări, ele avînd întinse aplicații practice în domeniul biologiei, în general, și al medicinei, în special. Astfel, în prezența anticorpului o suspensie bacteriană omogenă se poate sedimenta (fenomenul de aglutinare), o soluție antigenică perfect limpede se poate tulbura (fenomenul de precipitare și floculare), o toxină puternică poate deveni inofensivă (fenomenul de neutralizare a toxinei), un virus patogen poate pierde aceste însușiri (fenomenul de neutralizare a virusurilor), suspensiile de bacterii sau de globule roșii, rezistente față de acțiunea litică a alexinei pot deveni sensibile față de această acțiune (fenomenele de bacterioliză și hemoliză) etc. Organismul animal însuși, în prezența anticorpilor, își modifică modul de reacție față de antigenii respectivi. Aceste modificări, impuse antigenului prin anticorpi, și-au găsit aplicații în diagnosticul speciilor microbiene și al infecțiilor microbiene. În același timp, ele explică mecanismul acțiunii antiinfecțioase a anticorpilor.

Unele modificări suferite de antigeni, în prezența anticorpilor, pot fi puse în evidență mai cu seamă in vitro: aglutinarea, precipitarea, altele atît in vitro, cît și in vivo — bacterioliza, hemoliza — iar, în fine, altele de regulă, numai in vivo — neutralizarea toxinelor și virusurilor.

Vom examina acum diversele modificări pe care anticorpii, prin prezența lor, le imprimă antigenilor sau organismelor animale.

Scanned with OKEN Scanner

AGLUTINAREA
(SENSIBILIZAREA PARTICULELOR ANTIGENICE DINTR-O SUSPENSIE FAŢĂ DE ACŢIUNEA AGLUTINANTĂ A ELECTROLIŢILOR)

Aglutinarea bacteriilor de către anticorpii prezenţi în serurile imune a fost observată, pentru prima oară, în 1899, de Charrin şi Roger. Autorii, cultivînd bacilul piocianic în serul imun respectiv, au constatat că aspectul cultural în acest mediu lichid nu este cel obişnuit. Astfel, în timp ce germenul tulbură uniform bulionul, în serul imun bacteriile se dezvoltă, dar toate se găsesc aglutinate la fundul tubului. Cercetările de mai tîrziu au arătat că suspensiile bacteriene în apa fiziologică pot fi şi ele aglutinate de către anticorpii serurilor imune.

Serurile imune care au însuşirea de a aglutina se numesc aglutinante, iar anticorpii răspunzători de această acţiune, aglutinine. Serurile aglutinante se prepară, în mod curent, pe animale de experienţă, dintre care iepurele se pretează cel mai bine. Antigenul (suspensia microbiană) este constituit, de regulă, din germeni morţi, în cazul speciilor patogene, din germeni vii, în cazul celor nepatogene. El se injectează, de obicei, pe cale intravenoasă. Cîteva injecţii de cultură sînt, în general, necesare pentru a obţine un ser bogat în aglutinine. După 6—10 zile de la ultima injecţie de antigen, animalul poate fi sîngerat, iar serul obţinut se titrează faţă de antigenul omolog, stabilindu-se astfel titrul său aglutinant.

Microbii aglutinabili prin anticorpi conţin antigeni care se cuplează cu anticorpii, aglutinarea fiind consecinţa acestei cuplări. Antigenii care, cuplîndu-se cu aglutininele, duc la sedimentarea germenilor se numesc aglutinogeni. Unii aglutinogeni sînt termostabili — antigenii somatici ai salmonelelor, de exemplu — alţii sînt termolabili — antigenii flagelari sau ciliari ai speciilor mobile.

Principial, pentru a face o reacţie de aglutinare sînt necesare serul aglutinant şi antigenul. Serul aglutinant trebuie să aibă o activitate cunoscută. Antigenul este constituit dintr-o suspensie microbiană omogenă şi stabilă. Cele două elemente pot fi puse în contact într-o picătură pe o lamă (metoda rapidă), în tuburi de reacţie (metoda lentă) sau în mediu de cultură (metoda aglutinării în stare născîndă). Reacţia de aglutinare poate fi văzută cu ochii liberi, cu lupa sau la microscop. Ea poate apărea în cîteva minute după amestec, în cîteva ore sau după 24—48 de ore. Ea se produce mai repede la 37°C ca la temperatura camerei, apare însă şi la temperaturi mai mari de 37°C şi unele reacţii de aglutinare se fac, de exemplu, la 45°C. Viteza de apariţie a reacţiei este în funcţie de activitatea serului şi de natura antigenului. Serurile mai bogate în anticorpi produc o reacţie mai rapidă ca cele mai sărace. Germenii diverselor specii bacteriene nu sînt egal de sensibili faţă de aglutininele respective. În general, germenii mobili sînt mai repede aglutinaţi de anticorpii ciliari respectivi decît germenii imobili de aglutininele somatice.

Seroaglutinarea are aplicaţii largi în diagnosticul speciilor microbiene, ca şi în diagnosticul infecţiilor. Executarea reacţiilor de seroaglutinare se face după mai multe metode.

Scanned with OKEN Scanner

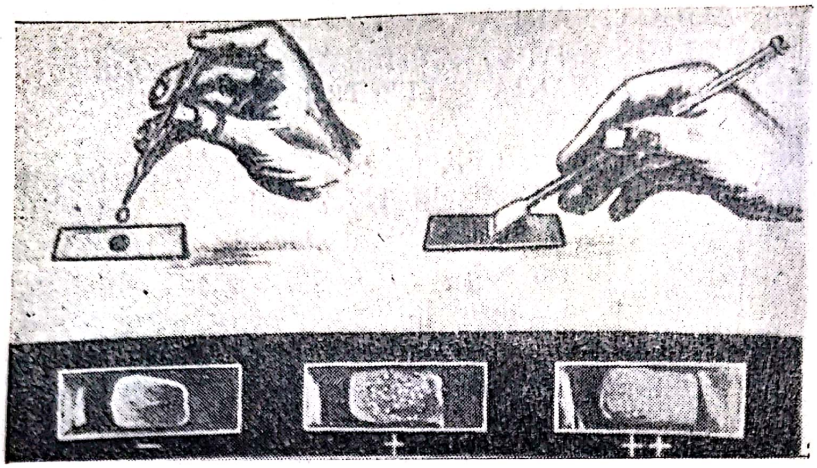


Fig. 47 — Aglutinarea rapidă cu sînge pe lamă (după **Dahmen**)

Aglutinarea rapidă. Se folosesc lame obişnuite, bine degresate, sau plăci de sticlă curate. Pe o lamă se pun trei picături de suspensie bacteriană, care se obţine spălînd cultura de pe un tub de agar cu 1—2 ml apă fiziologică. În prima picătură se adaugă o picătură de ser aglutinant, în a doua, o picătură de ser normal provenind de la aceeaşi specie care a furnizat serul aglutinant şi, în a treia, o picătură de ser fiziologic. O reacţie este socotită pozitivă cînd numai germenii din prima picătură au fost aglutinaţi. Dacă germenii din picătura întîi ca şi cei din picătura a doua sînt aglutinaţi, înseamnă că specia care a dat serul aglutinant conţine, în serul său, aglutinine normale pentru germenul examinat. Dacă aglutinarea se produce în toate cele trei picături, înseamnă că suspensia bacteriană folosită aglutinează spontan şi deci este improprie acestui fel de reacţie.

Aglutinarea lentă permite să se stabilească conţinutul în aglutinine al unui ser sau, ceea ce se numeşte, în mod curent, titrul său aglutinant. Reacţia se face în tuburi mici, înalte de 6—10 cm şi cu deschiderea de 1—1,2 cm, dar se poate face şi în tuburi Hirst, citirea făcîndu-se, în acest din urmă caz, pe baza imaginii de fund. Suspensia bacteriană se obţine din culturi pe agar sau de pe alt mediu solid sau din culturi în bulion sau alte medii lichide. Germenii se spală, în general, prin centrifugare. Suspensia trebuie să aibă un anumit grad de turbiditate, care variază de la un germen la altul. Ea se distribuie în tuburi şi se amestecă cu cantităţi diferite de ser. Diluţia serului variază şi ea în raport cu germenul şi cu titrul serului. Citirea reacţiei se face după un timp variabil, în raport cu natura antigenului şi a serului.

Aglutinarea în stare născîndă se foloseşte, de obicei, pentru speciile bacteriene care nu dau culturi abundente pe agarul nutritiv şi produc în schimb, culturi omogene în medii lichide. Se întrebuin-

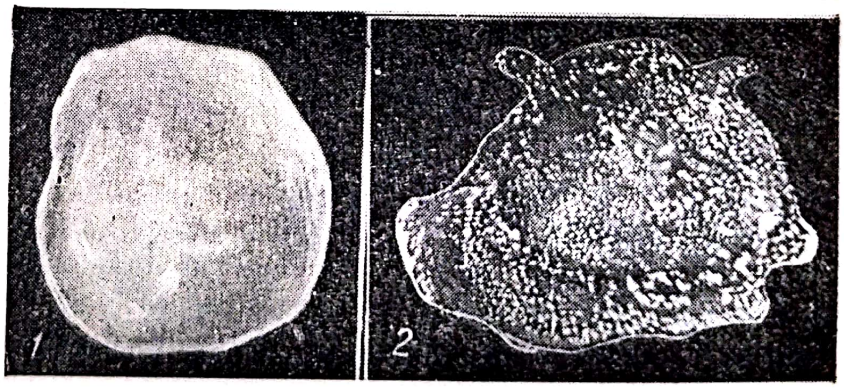


Fig. 48 — Aglutinarea rapidă cu sînge pe lamă (după **Heelsbergen**)
1 — reacţie negativă; 2 — reacţie pozitivă

Scanned with OKEN Scanner

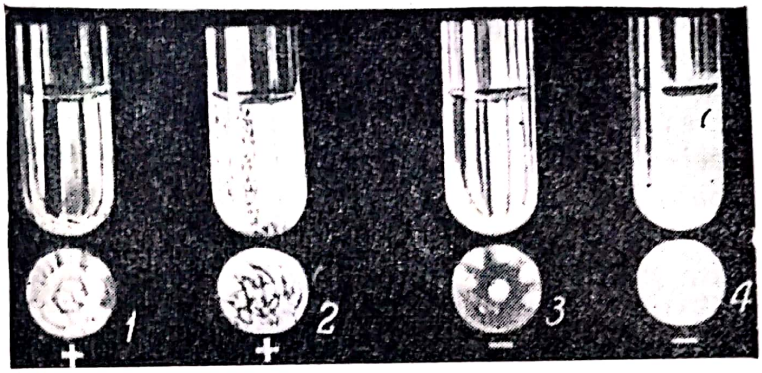


Fig. 49 — Aglutinarea lentă în tuburi (după **Dahmen**)

1 — reacţie pozitivă, înainte de agitare; 2 — acelaşi tub după agitare; 3 — reacţie negativă, înainte de agitare; 4 — acelaşi tub după agitare

ţează, astfel, în mod curent, pentru a determina titrul aglutinant al serului antirujetic. In acest scop, se repartizează, în tuburi obişnuite, cîte 9 ml de mediu lichid nutritiv — bulion spre exemplu. In primul tub se pune 1 ml din serul de examinat (care trebuie să fie steril) şi în acest tub serul este diluat deci 1/10. După ce acest prim tub a fost bine agitat, se ia din el 1 ml şi se adaugă în al doilea tub, obţinînd, astfel, o diluţie 1/100. Procedînd, mai departe, în acelaşi mod, se obţin diluţii 1/1000, 1/10 000 etc., oprindu-ne la o diluţie la care, rezumativ, serul nu mai poate fi activ. Apoi se însămînţează în fiecare tub cîte o picătură dintr-o cultură proaspătă de bacilul rujetului. Tuburile se pun la termostat, citirea făcîndu-se după 24 şi 48 de ore. Cantitatea minimă de ser care a provocat dezvoltarea unei culturi aglutinate de rujet reprezintă doza minimă activă.

Mecanismul de aglutinare. In cursul aglutinării, anticorpii din ser se consumă prin cuplarea lor cu antigenul. Această cuplare se poate pune în evidenţă prin metode volumetrice, constatîndu-se că o suspensie bacteriană, care a adsorbit anticorpii respectivi, îşi măreşte volumul cu aproximativ 20%. O cantitate de ser aglutinant nu poate aglutina decît un număr limitat de celule bacteriene. Uniunea dintre aglutinine şi aglutinogen este suficient de solidă. Apa distilată, soluţiile sărate concentrate, modificările de pH, capabile să desfacă alte complexe antigen-anticorp, nu au o asemenea influenţă asupra celui constituit de aglutinină-aglutinogen (Machebouef şi Viscontini).

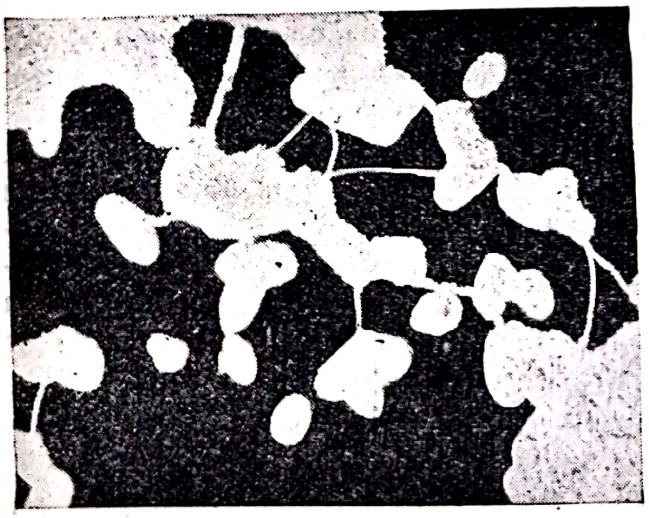


Fig. 50 — Aglutinarea prin anticorpi H la *Salmonella typhosa* (după **Pyjper**).
Microfotografie în cîmp întunecat

Adsorbţia unor aglutinine dintr-un ser care conţine mai mulţi anticorpi (metoda lui Castelani) se sprijină tocmai pe constatarea că în general aglutininele se fixează solid pe aglutinogen şi că simpla centrifugare nu poate desface complexul. Dacă, spre exemplu, dintr-un ser aglutinant preparat cu o bacterie mobilă şi care deci conţine anticorpi somatici şi

ciliari vrem să eliminăm anticorpii somatici, amestecăm serul respectiv cu o suspensie de bacterii aparţinînd aceleiaşi specii, însă căreia i s-au distrus, prin fierbere, aglutinogenii ciliari. Această suspensie adăugată în exces va fixa anticorpii somatici din ser. Prin centrifugare eliminăm corpii bacterieni, lichidul clar obţinut neconţinînd decît anticorpii ciliari. Metoda poate fi adaptată diverselor scopuri pe care le urmărim în bacteriologie.

Complexul aglutinogen-aglutinină se poate totuşi desface prin anumite procedee. Astfel, tratarea cu soluţii de uree (Gostev şi Sadkov, 1953) sau încălzirea la temperatura de 50°C a unei suspensii bacteriene aglutinate, care deci a fixat aglutininele dintr-un ser, desprinde aglutininele de aglutinogen, cele două elemente reluîndu-şi proprietăţile lor iniţiale. Desfacerea e, în general, incompletă ; cu cît timpul de contact dintre cele două elemente a fost mai lung, cu atît desfacerea se face mai greu şi în proporţie mai redusă. Unirea dintre anticorp şi antigen se perfectează deci în timp. Faptul că un complex deja format se poate desface, cele două elemente reluîndu-şi însuşirile iniţiale, dovedeşte că anticorpul nu alterează iremediabil antigenul.

Gostev şi Sadkov (1953) au arătat că o dată cu globulina-anticorp se fixează pe antigen în mod nespecific şi alte albumine serice, dar care se desprind mai uşor de pe antigen decît anticorpii.

Pentru ca o suspensie bacteriană omogenă să se aglutineze, nu este nevoie numai de anticorpii respectivi, ci şi de prezenţa electroliţilor (Bordet, 1899). Cuplarea aglutininelor cu aglutinogenul se face în absenţa sărurilor, însă germenii care au fixat aglutininele nu formează grămezi decît datorită acţiunii aglutinante a electroliţilor. S-ar putea deci spune că anticorpii sensibilizează bacteriile faţă de acţiunea aglutinantă a electroliţilor. Aglutinarea, ca şi alte reacţii dintre anticorp şi antigen, comportă deci două faze : prima este constituită de cuplarea specifică a celor două componente, fază în care, sub influenţa anticorpului, se produc modificări privind raporturile fizice de atracţie, pe de o parte, dintre corpii microbieni între ei, iar, pe de altă parte, dintre aceşti corpi şi lichidul în care ei sînt puşi în suspensie, şi a doua fază care constă din intervenţia unui element nespecific, în cazul aglutinării — electroliţii. Electroliţii sînt recunoscuţi ca factori floculanţi faţă de diverse particule ce se găsesc în suspensie. Astfel, unele specii sau variante bacteriene sînt aglutinate de electroliţi în atara acţiunii anticorpilor. În acest mod se comportă, de exemplu, suspensiile de bacilii cărbunelui sau variantele R ale speciilor din grupul *Salmonella*. În timp ce variantele S dau în bulion suspensii omogene, cele R, în acelaşi mediu, sînt aglutinate. În stratul periferic al formelor S se găsesc substanţe care le fac rezistente la acţiunea aglutinantă a electroliţilor. Acest strat exterior, în cazul aglutinării, este modificat, prin cuplarea sa cu anticorpii, în aşa fel încît bacteria devine hidrofobă şi sensibilă faţă de electroliţi.

Seroaglutinarea nu se poate aplica, ca reacţia de diagnostic diferenţial, decît la specii bacteriene care dau în bulion sau în apă fiziologică suspensii de o oarecare stabilitate. Reacţia nu este proprie deci pentru speciile sau rasele bacteriene ca *Bacillus anthracis*, unii streptococi, variantele R

Scanned with OKEN Scanner

ale speciilor bacteriene Gram negative etc., care aglutinează spontan în apă fiziologică sau în mediile de cultură lichide.

Unele substanţe chimice, printr-o acţiune, probabil, similară celei exercitate de anticorpi, pot aglutina unele suspensii bacteriene omogene. Astfel, tripaflavina aglutinează unele variante de bacili ai dizenteriei. Substanţele coagulante ca alcoolul, sublimatul, formolul, în concentraţii mari, pot, la fel, aglomera unele suspensii bacteriene omogene.

Un exces de anticorpi poate împiedica producerea aglutinării. Acest fenomen de inhibiţie, numit şi fenomen de zonă, poate fi datorit, în unele cazuri, acţiunii antiaglutinante a proteinelor serice.

Puterea aglutinantă a unui ser nu scade prin încălzire la 56°C, adică prin distrugerea alexinei. Aglutinarea se face deci în absenţa alexinei. Alexina, după unele cercetări, ar putea chiar inhiba aglutinarea ; folosind un ser aglutinant proaspăt, deci care conţine alexină, se observă, uneori, într-adevăr, că aglutinarea nu se produce în primele tuburi care conţin o cantitate mai mare de ser şi deci de alexină, ci apare în tuburile care conţin serul în diluţii mai mari. Această inhibiţie efectuată de o concentraţie prea mare de ser şi cunoscută de mult timp ar fi datorită alexinei. Acest fenomen nu se observă, într-adevăr, dacă serul aglutinant este inactivat.

Prin coagulare la temperatura de 65—70°C serul aglutinant pierde, în mare parte, activitatea sa. Dar, din acest punct de vedere, se constată diferenţe între serul aglutinant provenind de la diverse specii animale. Astfel, aglutininele din serul de cobai sînt mai sensibile la căldură ca cele de iepure pentru motivul că serul primei specii animale se coagulează mai uşor ca al celei din urmă.

Specificitatea reacţiei. Reacţia de seroaglutinare este totdeauna specifică, în sensul că atunci cînd un ser a aglutinat o bacterie aceasta dovedeşte că bacteria conţine cel puţin un antigen căruia îi corespunde un anticorp în serul folosit. Dacă această reacţie nu permite totdeauna să se distingă o specie bacteriană de alta, acest fapt nu se datoreşte nespecificităţii sale, ci faptului că bacteriile mult înrudite au în structura lor antigeni comuni. Datorită prezenţei acestor substanţe comune, un ser aglutinant preparat cu agentul febrei tifoide poate aglutina şi alţi germeni din grupul *Salmonella*. Dar, dacă unele specii au antigeni comuni, ei posedă în structura lor şi substanţe antigenice proprii. Astfel, bacilul tifosului are antigeni comuni cu alte salmonele, dar are şi un antigen caracteristic numai lui. Un ser preparat deci cu acest microb va avea anticorpi şi faţă de alţi germeni decît cel ce a servit la prepararea sa, dar va conţine un anticorp activ numai faţă de bacilul tifosului. Pentru a putea diferenţia, prin seroaglutinare, bacilul tifosului de alte bacterii înrudite, trebuie să eliminăm din ser toţi anticorpii comuni şi să păstrăm numai pe cei caracteristici, adică pe acei care aglutinează numai bacilul tifosului. Pentru a realiza această eliminare se recurge la metoda de adsorbţie a aglutininelor, numită încă şi metoda Castellani, folosindu-se, în acest scop, tocmai bacteriile înrudite, care sînt puse în contact cu serul imun. Acestea vor fixa anticorpii comuni, dar nu pe cel caracteristic, pentru motivul că nu conţin antigenul fixator respectiv.

Scanned with OKEN Scanner

PRECIPITAREA (FLOCULAREA)
(SENSIBILIZAREA PARTICULELOR ANTIGENICE DINTR-O SOLUȚIE FAȚĂ DE ACȚIUNEA FLOCULANTĂ A ELECTROLIȚILOR)

Fenomenul de precipitare sau, mai bine, de floculare a unor particule antigenice dintr-o soluție a fost descoperit de Kraus în 1897. Autorul observă că extractele clare, obținute prin fierberea culturilor de *Vibrio cholerae,* se tulbură atunci cînd sînt amestecate cu serul imun respectiv. În 1899, Tchistovich și Bordet au constatat că și proteinele animale sînt precipitate de anticorpii pe care aceste substanțe i-au produs în organismul animal. Reacția de seroprecipitare, în urma acestor constatări, a căpătat diverse și numeroase aplicații practice. Medicina legală, inspecția alimentelor, serviciile de diagnostic al bolilor infecțioase, laboratoarele de diagnostic al speciilor bacteriene etc. fac apel la ea, în împrejurări diverse.

ELEMENTELE NECESARE EXECUTĂRII REACȚIEI

Serurile precipitante se obțin pe animale. Iepurele și calul produc în general bune seruri precipitante. Majoritatea iepurilor dau, de exemplu, un ser precipitant anticărbunos suficient de activ după nouă injecții intravenoase de antigen, făcute la interval de 3 zile.

Serurile precipitante își conservă însușirile, în medie, 2 ani. Prin adăugarea antisepticelor, activitatea lor nu este micșorată. Un bun antiseptic conservator îl constituie următorul amestec: 5 ml de fenol, 2 ml de glicerină și 100 ml de apă distilată; pentru 10 ml de ser se adaugă 0,6—0,8 ml din acest amestec.

Anticorpii precipitanți se mai numesc și precipitine, iar materia precipitabilă, precipitinogen.

Soluțiile de antigen. Materia precipitabilă se poate extrage din culturi bacteriene prin fierbere. În acest scop, suspensii dense — 5 ml de apă fiziologică pentru o cultură pe agar înclinat — de bacili ai cărbunelui, spre exemplu, se fierb 5 minute, obținîndu-se astfel un lichid cu o concentrație suficient de puternică în materie precipitabilă. Lichidul se filtrează sau se decantează; în orice caz el trebuie să fie perfect limpede.

Prin metode chimice s-au putut extrage, din corpul diverselor specii bacteriene, materia precipitabilă a cărei natură chimică a putut fi precizată. Culturile virulente de pneumococi conțin, de exemplu, o substanță de natură hidrocarbonată.

Executarea reacției de precipitare se poate face după două procedee.

Primul procedeu (seroprecipitarea). Extractul bacterian sau altă soluție antigenică se distribuie în tuburi de reacție; înălțimea coloanei de lichid trebuie să fie de aproximativ 1 cm. Serul precipitant se adaugă pe fundul tubului, cu o pipetă Pasteur bine efilată; el nu trebuie să se amestece cu soluția antigenică, astfel că cele două lichide constituie două straturi distincte, unul inferior, constituit de ser, altul superior, din antigen. Într-un al doilea tub se adaugă, peste antigen, în același mod, ser normal. Acest din urmă tub servește drept martor. Reacția pozitivă se traduce prin formarea unui inel albicios la suprafața de separație a celor două lichide — serul imun și soluție antigenică. Reacția pierde toată valoarea sa dacă un asemenea inel se formează în tubul în care s-a adăugat ser normal. Inelul

Scanned with OKEN Scanner

de precipitare, în cazul reacţiei pozitive, se poate face imediat sau în cîteva minute; el se îngroaşă şi, peste cîteva ore, cade ca o membrană la fundul tubului.

Al doilea procedeu (seroflocularea). În mai multe tuburi de reacţie se repartizează un volum constant de antigen, 1—5 ml, peste care se adaugă, sub acelaşi volum, diluţii crescînde de ser. În primul tub, de exemplu, 1 ml de ser diluat $^1/_2$, în al doilea 1 ml de ser diluat $^1/_4$, în al treilea 1 ml de ser diluat $^1/_8$ etc. Se lucrează repede. O dată serul repartizat se agită tuburile şi apoi se urmăreşte reacţia, care se traduce prin opacifierea lichidului, care iniţial trebuie să fie perfect limpede. Opacifierea nu apare în toate tuburile în acelaşi timp, ci întîi apare într-un tub oarecare din serie, apoi la tuburile imediat vecine şi cu cît un tub este mai depărtat pe stativ de primul tub în care a apărut reacţia, cu atît opacifierea sa se face mai tîrziu. Landsteiner (1914, 1920) a constatat, urmărind flocularea toxinelor de către antitoxinele respective, că flocularea se produce întîi în tubul în care raportul dintre antigen şi anticorp se apropie de unitate, acolo unde cantitatea de anticorpi din ser neutralizează perfect — aşa cum arată inoculările la animale — antigenul. Unirea antigenului cu anticorpul se face mai repede în tubul în care nu există în exces nici anticorpi, nici antigen, acolo deci unde se constată consumul total al anticorpilor şi neutralizarea completă a toxinei [1]. Reacţia este mai tardivă în tuburile în care unul din cei doi componenţi este în exces. Această constatare a dus la instituirea unor metode practice de titrare fie a antitoxinelor sau a anticorpilor, în general, dintr-un ser, fie a toxinelor sau materiilor antigenice dintr-o soluţie. Reacţia permite să se determine valoarea toxică a diverselor filtrate bacteriene, precum şi conţinutul în antitoxine al serurilor hiperimune. Ea se poate folosi deci cu succes la titrarea oricărui precipitogen şi a oricărei precipitine.

Mecanismul reacţiei. Seroprecipitarea, ca şi seroaglutinarea, se face în absenţa alexinei. Un ser precipitant este tot aşa de activ după o încălzire de 30 de minute la 56°C ca şi înainte de această operaţie. Temperaturile mai ridicate — 65°C — care duc la coagularea proteinelor serice anulează puterea precipitantă a unui ser. Se afirmă că, la această temperatură, anticorpul nu este distrus, dar prezenţa sa nu se mai manifestă prin aglomerarea particulelor de antigen. În aceste condiţii, reacţia nu mai este vizibilă, deşi se produce cuplarea antigenului cu anticorpul. Afirmaţia se sprijină pe constatarea că un antigen, care a fost în contact cu un ser imun, respectiv încălzit la 65°C, pierde puterea sa fixatoare pentru precipitinele din acelaşi ser, însă neîncălzit.

Prezenţa electroliţilor este necesară floculării. Anticorpul nu produce precipitarea, ci numai sensibilizează particulele antigenice la acţiunea floculantă a electroliţilor.

Precipitatul care rezultă din contactul dintre precipitine şi pricipitinogen nu este cunstituit numai din particulele de antigen ce se găsesc dispersate în lichid, ci el include şi componentele serului imun. Pentru a demonstra această afirmaţie, se poate recurge la următoarea experienţă: într-un volum de apă fiziologică se pune o cantitate precis cîntărită de antigen şi

[1] Un exces de anticorpi în raport cu cantitatea de antigen folosită produce deci o întîrziere sau o inhibiţie totală a reacţiei, ceea ce se mai cunoaşte şi sub numele de „fenomenul de zonă".

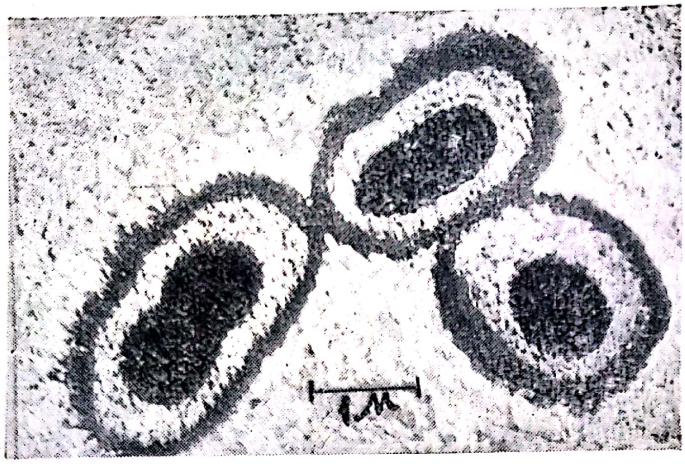


Fig. 51 — Capsula tumefiată a unor pneumococi capsulaţi sub acţiunea anticorpilor specifici (fenomenul Neufeld) (după **Mudd** şi col.) Imagine electronică (X 14100)

se constată prin cîntărire că precipitatul care s-a produs în prezenţa serului imun este mult mai greu decît antigenul pus iniţial în tub. S-a găsit, de exemplu, că 1 mg de albumină de ou poate da, în prezenţa serului precipitant respectiv, 26 mg de precipitat. Veninul şerpilor dă un precipitat de 35 de ori mai greu decît cantitatea de venin folosită. Aceste date dovedesc că materia din ser ia o parte importantă în construirea inelului de precipitare.

Pentru a aglutina o suspensie bacteriană sînt necesare, în general, cantităţi minime de ser. Un ser aglutinant anti-*Salmonella* poate aglutina o suspensie bacteriană aparţinînd speciei respective chiar în diluţii de 1/100 000 ml. Un ser precipitant nu este niciodată activ în asemenea diluţii. Pentru ca reacţia de precipitare să se producă este nevoie, într-adevăr de cantităţi însemnate de precipitine, ceea ce reiese şi din importanta lor participare la formarea inelului sau flocoanelor de precipitare. Cantităţi importante de anticorpi sînt necesare pentru motivul că puterea de adsorbţie a particulelor antigenice, care iau parte în reacţia de seroprecipitare, este mult mai mare în raport cu a celor ce iau parte în reacţia de seroaglutinare. O cantitate mică de ser nu poate satura imensa suprafaţă de adsorbţie pe care o oferă moleculele de precipitinogen. In acelaşi mod se explică constatarea făcută, printre alţii, şi de Tomocsik relativ la antigenul capsular al bacteridiei cărbunelui. Autorul constată că o concentraţie prea mare a precipitinogenului în lichidul supus acţiunii serului imun împiedică apariţia floculatului. Anticorpii din ser, în aceste condiţii, nu pot satura imensa suprafaţă de adsorbţie oferită de masa particulelor antigenice. Particulele rămîn astfel dispersate în apă, afinitatea dintre ele şi lichid fiind mai mare ca între ele şi anticorpi.

Precipitarea se face în condiţii optime atunci cînd pentru o cantitate de antigen se adaugă precipitinele necesare unei perfecte saturări. In aceste condiţii, afinitatea particulelor de antigen pentru anticorpii respectivi este mai mare ca pentru lichidul în care ele se găsesc dispersate şi particulele antigenice, încărcate cu anticorpi, se insolubilizează repede într-o soluţie de electroliţi, formînd flocoane vizibile.

Sensibilitatea reacţiei. Reacţia de seroprecipitare este foarte sensibilă. Cu ajutorul ei se poate, într-adevăr, descoperi într-un lichid cantităţi infinitezimale de antigen. Astfel, antigenul capsular, extras din bacteridia cărbunelui, este precipitat de un bun ser anticapsular, la diluţii ce depăşesc 1/1 000 000 g. Albuşul de ou şi, în general, proteinele sînt precipitate de serurile imune respective la diluţii foarte mari de antigen. Această sensi-

Scanned with OKEN Scanner

bilitate, la care se adaugă şi o însemnată specificitate, face ca reacţia să fie folosită în tipizarea tulpinilor diverselor specii bacteriene. Astfel, ea îşi găseşte aplicaţia în tipizarea tulpinilor de pneumococi, streptococi, stafilococi etc. şi dă, în general, în aceste cazuri, rezultate mai bune ca seroaglutinarea.

CITOLIZA
(SENSIBILIZAREA CELULELOR FAŢA DE ACŢIUNEA LITICA A ALEXINEI)

Alexina, aşa cum s-a spus mai sus, are proprietăţi litice care se exercită, în special, faţă de bacteriile saprofite. Această proprietate se poate exercita însă şi faţă de unele celule bacteriene sau animale (hematii, în special) dacă aceste elemente au fost, în prealabil, în contact cu serul imun, dacă, cu alte cuvinte, aceste celule, adică antigenii lor de suprafaţă, au fixat anticorpii respectivi. Cuplarea antigenilor celulei cu anticorpii respectivi modifică membrana celulelor respective în aşa fel încît celulele pot fi lizate de alexină. Ţinînd seama de ordinea cronologică vom cerceta în acest capitol întîi bacterioliza, apoi hemoliza şi, ca o aplicaţie a hemolizei, reacţia de fixare a complementului.

Bacterioliza a fost descoperită, în 1894, de Pfeiffer şi Isaef şi este cunoscută şi sub numele de fenomenul Pfeiffer-Isaef. Aceşti cercetători, urmărind acţiunea serurilor imune asupra bacteriilor respective, observă că serul antiholeric topeşte vibrionii holerei, atît in vitro cît şi in vivo. Experienţa a fost realizată în următoarele condiţii: o suspensie de vibrioni ai holerei vii se inoculează, pe cale intraperitoneală, la doi cobai, unul normal şi altul vaccinat cu culturi moarte de vibrioni; extrăgînd apoi lichid peritoneal, la intervale diferite de timp, s-a urmărit, la microscop, soarta germenilor introduşi. Procedîndu-se, în acest fel, s-a constatat că în lichidul peritoneal al cobaiului normal vibrionii îşi păstrează forma şi mobilitatea, se multiplică, omorînd, în scurt timp, animalul. La animalul vaccinat, procesul este cu totul diferit. In scurt timp după inoculare, vibrionii îşi pierd mobilitatea şi forma normală. In loc de bastonaşe uşor curbate se întîlnesc, din ce în ce mai frecvent, forme rotunde, sferice, granule, care se colorează greu şi care sînt totdeauna imobile. Aceste elemente degenerate se topesc şi dispar cu timpul din lichidul peritoneal. Leucocitele traversează peretele peritoneal şi înglobează, final, ultimele resturi de vibrioni. Animalul rămîne în viaţă.

Rezultate asemănătoare se obţin şi pe animale pasiv imunizate. Intr-adevăr, inocularea la un cobai normal a unui amestec de vibrioni ai holerei şi ser imun nu provoacă o peritonită holerică caracteristică. La fel, cobaii normali, injectaţi în ajun cu o cantitate de ser antiholeric, suportă perfect o inoculare intraperitoneală de vibrioni ai holerei virulenţi.

In vitro, acţiunea bactericidă a serului antiholeric nu se arăta, iniţial, constantă. Isaef şi Pfeiffer foloseau, probabil, seruri conservate în care principiul bactericid — alexina — era distrus prin simpla conservare. Bordet, în 1895, a arătat, într-adevăr, că un ser antiholeric conservat mult timp pierde puterea sa litică, dar şi-o recapătă atunci cînd se adaugă, peste amestec, puţin ser proaspăt provenind fie de la un animal vaccinat contra holerei, fie de la un animal normal. Bacterioliza se face deci în două faze: una o constituie sensibilizarea celulelor bacteriene, iar a doua inter-

Scanned with OKEN Scanner

venţia principiului litic normal — alexina. Alexina, care lizează singură germenii saprofiţi, nu este activă faţă de cei patogeni decît după ce aceştia au fost pregătiţi prin acţiunea anticorpului specific. Animalele nevaccinate sau neserumizate, neposedînd anticorpul specific, nu pot rezista forţei de invazie a bacteriilor patogene. Alexina, deşi este prezentă în aceste organisme, este lipsită, singură, de eficacitate.

Fenomenul de bacterioliză ca şi alte procese organice de apărare stau sub dependenţa sistemului nervos. Zabolotnîi şi Belusova au arătat, în această privinţă, că liza vibrionilor holerei la animale imune se face mai încet la spermofilii în hibernare decît la cei trezi.

Bacterioliza, ca şi celelalte reacţii dintre antigen şi anticorp este un fenomen specific. Transformarea în granule a vibrionilor holerei nu se face decît în cavitatea peritoneală a unui cobai vaccinat cu asemenea vibrioni sau injectat cu un ser antiholeric. Vibrionii înrudiţi cu vibrionii holerei nu se lizează în cavitatea peritoneală a unui cobai injectat cu ser antivibrion holeric. La fel, vibrionii holerei autentici nu se lizează în peritoneul unui cobai vaccinat cu alţi vibrioni decît cei ai holerei. Specificitatea acestei reacţii permite ca ea să fie folosită în scop de diagnostic. Avînd un ser antiholeric, se poate repede preciza dacă o tulpină de vibrioni, izolată de la un bolnav, este sau nu un vibrion al holerei autentic.

Hemoliza. J. Bordet, în 1898, plecînd de la constatarea că serul normal al unor specii animale poate aglutina globulele roşii ale altor specii, a injectat globulele roşii de iepure, la cobai, cu scopul de a exalta activitatea aglutinantă a serului de cobai pentru globulele roşii de iepure. Rezultatul obţinut a întrecut aşteptările. Serul unui asemenea cobai era nu numai puternic aglutinant, dar devenise şi hemolizant. Aglutinarea globulelor era urmată de difuzarea hemoglobinei în lichidul în care se găseau globulele. Fenomenul s-a dovedit mai tîrziu general : ori de cîte ori se injectează unui animal globulele roşii provenind de la altă specie animală apar anticorpii aglutinanţi şi hemolizanţi.

Hemoliza globulelor roşii de către serul imun respectiv se face nu numai in vitro, ci şi in vivo. Într-adevăr, injectarea unui ser hemolitic anticobai, la un cobai, provoacă tulburări grave datorite lizei globulelor roşii (hemolizei) din circulaţia generală.

Mecanismul hemolizei a fost descoperit de Bordet (1899). Injectînd globulele roşii ale unei specii animale la un animal aparţinînd altei specii, iau naştere, aşa cum s-a spus mai sus, anticorpi care hemolizează globulele roşii ale acestei din urmă specii atît in vitro cît şi in vivo. O serie de cercetări au lămurit mecanismul hemolizei prin anticorpi. S-a observat în acest sens, şi în primul rînd, că un ser hemolitic dovedit activ pierde această activitate prin învechire sau prin încălzire la 56°C timp de 30 de minute. În faţa acestei constatări s-a crezut că anticorpul hemolitic este extrem de fragil şi diferă, din acest punct de vedere, de alţi anticorpi. O experienţă simplă a arătat însă că alta este cauza acestei inactivităţi. Prin încălzire nu se distruge anticorpul propriu-zis, ci un alt factor care ia parte activă în desăvîrşirea hemolizei.

Iată experienţe care dovedesc acest lucru. În trei tuburi de reacţie se distribuie cîte 1 ml de suspensie de globule roşii de oaie. In primul şi al doilea tub se adaugă cîte două picături de ser antioaie, încălzit ½ de oră la 56°C. In aceste condiţii şi după ½ de oră la 37°C nu se constată hemo-

liza globulelor în nici un tub. În primul şi în al doilea tub se adaugă acum cîteva picături de ser normal provenind de la un animal din aceeaşi specie cu cel ce a furnizat serul imun sau aparţinînd unei alte specii. Tuburile, după această operaţie, sînt puse din nou la termostat şi după 15—30 de minute se constată hemoliza sîngelui din primul tub, adică în acela care conţine: globule roşii, ser imun încălzit şi ser normal proaspăt. În al doilea tub în care globulele roşii sînt în contact numai cu serul imun încălzit, precum şi în al treilea tub în care s-a adăugat, peste globulele roşii, numai ser normal proaspăt nu s-a produs hemoliza. Se poate conclude, deci, în urma acestei experienţe, că hemoliza este rezultatul acţiunii combinate a doi factori, din care unul se găseşte în serul imun, iar al doilea în serul normal. Într-adevăr, aşa cum reiese din experienţa de mai sus, nici serul imun încălzit şi nici serul normal nu pot provoca separat hemoliza globulelor roşii. Care sînt însuşirile celor doi factori care împreună produc hemoliza globulelor roşii? Factorul care se găseşte în serul imun este un anticorp specific şi a fost numit anticorp sensibilizant sau sensibilizatrice. Ca şi aglutininele şi precipitinele, el rezistă la temperatura de 56°C. Temperaturi mai ridicate care duc la coagularea serului distrug însă şi acest anticorp. Anticorpul sensibilizant, ca şi ceilalţi anticorpi, are o puternică afinitate pentru antigenul care i-a provocat apariţia. O experienţă simplă ne dovedeşte acest lucru. Să amestecăm o suspensie de globule roşii cu ser imun respectiv, încălzit la 56°C; după $^1/_2$ de oră de contact la 37°C să spălăm, prin centrifugare, globulele roşii de lichidul în care acestea se găsesc. Mai mult încă, să spălăm prin centrifugare, de cîteva ori, aceste globule cu apă fiziologică, pentru a elimina orice urmă de ser imun. Globulele, astfel spălate, să le punem în suspensie în apă fiziologică şi peste această suspensie să adăugăm puţin ser normal proaspăt. Ei bine, chiar în aceste condiţii globulele roşii se vor hemoliza; ele au fixat aşa de solid anticorpul încît acesta nu a putut fi eliminat prin spălare. Anticorpul s-a fixat pe globule, sensibilizîndu-le faţă de acţiunea celui de-al doilea factor hemolitic prezent în serul normal.

Principiul care se găseşte în serul normal şi care nu are nici o acţiune asupra globulelor roşii normale, dar hemolizează pe cele ce au adsorbit anticorpul este alexina.

Care este mecanismul colaborării dintre cele două elemente — sensibilizatrice şi alexină — care produc hemoliza? Am văzut mai sus că globulele roşii fixează, în mod solid, sensibilizatricea şi că aceste globule încărcate cu anticorpi se lizează în prezenţa alexinei. Experienţe simple ne pot demonstra că în lichidul hemolizat nu mai există nici alexină, nici sensibilizatrice. Cele două elemente s-au consumat deci în cursul reacţiei. Globulele roşii încărcate cu anticorpi au atras şi au fixat şi alexina. Dar, se poate pune întrebarea dacă numai acest complex antigen-anticorp are această însuşire, ori fiecare component în parte poate fixa alexina dintr-un ser normal? Repetate experienţe au dovedit că numai complexul este activ din acest punct de vedere, că numai el are afinităţi pentru alexină, în timp ce cele două elemente separate nu pot fixa alexina. Pentru a demonstra acest lucru nu avem decît să amestecăm globulele roşii de oaie cu ser proaspăt — ser cu alexină — de cobai. După 1 oră de contact să separăm, prin centrifugare, globulele roşii de lichidul în care plutesc şi punîndu-le apoi în suspensie în apă fiziologică le amestecăm cu puţin ser hemolitic anti-

Scanned with OKEN Scanner

oaie. Hemoliza nu se va produce. Dacă alexina era fixată de globulele roşii, ea trebuie să se producă. Antigenul deci nu fixează alexina. În condiţii asemănătoare s-a demonstrat că nici sensibilizatricea nu are însuşiri fixatoare. Alexina nu este deci fixată decît de complexul antigen-anticorp.

Reacţia de fixare a complementului. Studiul hemolizei prin serul imun a dus la o constatare importantă şi anume că din cuplarea anticorpului cu antigenul rezultă un complex capabil să fixeze alexina. Dar s-a pus întrebarea: numai complexul rezultat din fixarea hemolizinei pe globula roşie are această însuşire? Alţi anticorpi nu se comportă la fel atunci cînd se cuplează cu antigenii respectivi? Experienţele lui Bordet şi Gengou (1901) au arătat că, în general, toţi antigenii, cînd sînt injectaţi la animale, provoacă apariţia anticorpilor sensibilizanţi şi că aceştia, fixîndu-se pe antigeni, formează complexe fixatoare de alexină. Nu totdeauna însă fixarea alexinei este însoţită, ca în cazul hemolizei sau al bacteriolizei, de fenomene vizibile. De aceea, pentru ca fixarea să fie făcută vizibilă, a trebuit să se găsească un indicator, un complex care să pună în evidenţă fixarea alexinei şi dispariţia ei din amestec. Acest complex revelator îl constituie tocmai globulele roşii sensibilizate, care, după cum am văzut nu se lizează decît în prezenţa alexinei. Iată cum au fost realizate, de către Bordet şi Gengou, în 1901, primele experienţe care dovedesc prezenţa sensibilizatricei şi în alte seruri imune decît în cel hemolitic. În trei tuburi de reacţie, autorii fac separat, următoarele amestecuri: în primul tub 0,5 ml ser normal de cobai + 0,5 ml dintr-o suspensie de vibrioni ai holerei (o cultură de pe agar, în 5 ml de apă fiziologică) + 0,3 ml ser de iepure imunizat faţă de vibrioni şi încălzit 30 de minute la 56°C; în al doilea tub se pun aceleaşi elemente, afară de al treilea, care este înlocuit cu acelaşi volum de ser normal de iepure, deci ser fără anticorpi sensibilizanţi; în al treilea tub se pune aceleaşi elemente ca şi în primul, cu deosebirea că suspensia bacteriană — antigenul — este înlocuită cu apă fiziologică. În primul tub există deci alexina, anticorp şi antigen, în al doilea numai alexina şi antigen şi în al treilea alexină şi anticorp. După 1 oră de contact se adaugă, în fiecare din cele trei tuburi, globulele roşii sensibilizate. După ½ de oră la 37°C se constată hemoliza completă în tuburile 2 şi 3 şi absenţa hemolizei în tubul 1. Deci în tubul 1 s-a realizat complexul fixator de alexină şi aceasta a dispărut din lichid şi deci hemoliza globulelor roşii sensibilizate nu s-a putut face: în tuburile 2 şi 3 unde exista fie numai anticorp, fie numai antigen, alexina nu s-a fixat, a rămas disponibilă şi a efectuat hemoliza globulelor sensibilizate.

S-a putut demonstra mai tîrziu că nu numai vibrionii holerei, dar şi alte microorganisme şi, în general, toţi antigenii pot provoca apariţia anticorpilor sensibilizanţi. Recurgînd la procedeul imaginat de Bordet şi Gengou, se pot institui metode de diagnostic al infecţiilor produse de diverşi paraziţi. Cu ajutorul acestui procedeu se pot descoperi, ca şi cu celelalte reacţii serologice, fie anticorpii dintr-un ser, fie antigenul dintr-o soluţie. Metoda lui Bordet-Gengou, cunoscută sub numele de reacţia de fixare a complementului sau a alexinei, este extrem de sensibilă. În unele infecţii oculte este singura care poate fi cu succes folosită ca metodă de diagnostic. Astfel, în diagnosticul sifilisului, reacţia de fixare a complementului numită, în acest caz, reacţia lui Wassermann, pentru motivul că acest autor a adoptat-o acestui scop, este o reacţie de bază.

Scanned with OKEN Scanner

In medicina veterinară, reacţia de fixare a complementului se foloseşte pe o scară întinsă, în diagnosticul morvei şi durinei la cabaline, brucelozei la bovine şi porcine etc.

Pentru ca rezultatele obţinute prin reacţia de fixare a complementului să fie valabile, este absolut necesar ca elementele reacţiei să fie adăugate în cantităţi anumite, iar însuşirile lor să corespundă cerinţelor. Nu se poate obţine, de exemplu, un rezultat valabil, dacă antigenul folosit adsoarbe alexina în afara prezenţei anticorpului sau dacă alexina nu este activă sau dacă este adăugată în cantităţi prea mari, astfel că ea poate satisface complexul antigen-anticorp, rămînînd, în acelaşi timp, o cantitate suficientă pentru hemoliza globulelor roşii sensibilizate. De asemenea, antigenul folosit trebuie să fixeze anticorpul său ; de aceea el nu se foloseşte în scop de diagnostic decît după ce a fost încercat întîi cu un ser care conţine, în mod sigur, anticorpii respectivi şi apoi cu unul care, în mod sigur, nu-i conţine. In acest mod ne dăm seama dacă antigenul formează cu anticorpul complexe fixatoare de alexină şi dacă nu cumva poate forma complexe asemănătoare şi cu serul normal. Iată cum se obţin şi cum se titrează diversele elemente care intră în reacţia de fixare a complementului.

Globulele roşii se obţin de la oaie, pentru că serul hemolitic este, de regulă, un ser antioaie. In vederea obţinerii globulelor roşii sîngele se recoltează de la berbeci, aseptic, fie într-un balon cu perle de sticlă, fie în vase cu citrat sau oxalat sau cu oricare altă substanţă anticoagulantă. Globulele roşii din sîngele defibrinat (balonul cu perle de sticlă) sau citratat se centrifughează, îndată după recoltare, iar plasma se înlocuieşte cu apă fiziologică şi, după ce se spală de 2—3 ori cu apă fiziologică, depozitul de globule se pune la rece (4—8°C). Suspensia de globule astfel preparată şi păstrată la rece se poate folosi timp de 2—3 zile. Cînd suspensia se foloseşte după 2—3 zile de la recoltare, se recomandă să se facă o nouă spălare cu apă fiziologică înainte de întrebuinţare.

Serul hemolitic se poate prepara pe iepure sau pe cal. In vederea preparării serului, suspensia de globule de oaie preparată ca mai sus şi diluată $^1/_3$, se injectează, în general pe cale intravenoasă, pe cale intraperitoneală sau chiar subcutanată. Iată cum se procedează pentru a obţine, pe diverse căi, un bun ser hemolitic de la iepure.

Pe cale intravenoasă. Prima injecţie cu 1,5 ml ; după 6—8 zile, a doua injecţie cu 2 ml ; după 6—8 zile, a treia injecţie cu 2,5 ml.

Sîngerarea de probă se face după 8 zile de la ultima injecţie, recoltîndu-se, din cord, 20 ml de sînge. Dacă serul are un titru convenabil, animalul se sîngerează total sau parţial.

Pe cale intraperitoneală. Prima injecţie cu 30 ml ; după 8—10 zile, a doua injecţie cu 40 ml.

Sîngerarea se face după 9—10 zile de la ultima injecţie.

Pe cale subcutanată animalul se injectează, de 4—5 ori, la 6 zile interval, cîte 2—3 ml de suspensie de globule. Sîngerarea se face la 8 zile de la ultima injecţie.

Titrarea serului hemolitic. Se face o diluţie iniţială, de ser hemolitic (hemolizină) 1/10 în ser fiziologic. Plecînd de la această diluţie, se prepară mai departe diluţiile : 1/100, 1/1 000, 1/1 500, 1/2 500, 1/3 000, 1/3 500

(şi aşa mai departe pînă la 6 000). Din fiecare diluţie se pune cîte 1 ml în tuburi de reacţie (în fiecare tub o diluţie).

Se adaugă apoi cîte 0,5 ml de suspensie de globule roşii, diluată în proporţie de 2,5 la 100 ml de ser fiziologic. Se completează pînă la volumul de 2 ml cu ser fiziologic, deci se adaugă cîte 0,5 ml de ser fiziologic în fiecare tub. Se agită bine şi tuburile se pun 30 de minute la baia de 37°C. Apoi, se scot de la baie, se adaugă cîte 0,5 ml de alexină diluată 1/10, în ser fiziologic, se pun din nou la baia de 37°C timp de 30 de minute şi apoi se face citirea. Titrul este reprezentat de diluţia cea mai mare care a lizat complet globulele roşii.

La titrarea hemolizinei (serul hemolitic) se folosesc trei martori.

1. Martorul ser hemolitic în care se pun:
   1 ml de ser hemolitic diluţia cea mai mică (1 : 100);
   0,5 ml de suspensie de globule roşii 2.5%;
   1 ml de ser fiziologic.
2. Martorul globule roşii în care se pun:
   0,5 ml de suspensie de globule roşii 2,5%;
   2 ml de ser fiziologic.
3. Martorul alexină în care se pun:
   0,5 ml de suspensie de globule roşii 2,5%;
   1,5 ml de ser fiziologic;
   0,5 ml de alexină 1/10.

In toate aceste trei tuburi martore nu trebuie să se producă nici o urmă de hemoliză.

Redăm schematic în tabelul 40 titrarea serului hemolitic.

Tabelul 40

Titrarea serului hemolitic

Elemente	T U B U L I								Martor alexină	Martor ser hemolitic	Martor globule roşii
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII			
Ser hemolitic 1 ml din diluţia	1/100	1/500	1/1 000	1/1 500	1/2 000	1/2 500	1/3 000	1/3 500	—	1/100	—
Globule roşii (suspensie 2,5%) în ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser fiziologic în ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	1	2
Alexină diluţie de 1/10 în ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—	—

30 de minute la baia de 37°C

Alexina şi titrarea ei. Alexina se obţine, în general, de la cobai. Sîngerarea acestui animal poate fi totală sau parţială. În acest din urmă caz se poate recolta din cord o cantitate de 5 ml de sînge, fără a pune în pericol viaţa animalului. Conţinutul în alexină al serului de cobai este supus la multe variaţii, de aici necesitatea titrării ei înainte de executarea reacţiei de fixare a complementului. Titrarea se poate face în modul următor: într-o serie de nouă tuburi de reacţie se distribuie doze crescînde din 0,03 în 0,03 de ser proaspăt diluat 1/10 sau 1/15 şi chiar 1/20 şi anume: 0,1 ; 0,13 ; 0,16 ; 0,19..... 0,31. În ultimul tub, martor, nu se pune alexină. În fiecare tub se completează, cu apă fiziologică, volumul la 1,5 ml şi se adaugă 1 ml de sistem hemolitic. Tuburile se agită, se pun la baia de 37°C, iar rezultatul se citeşte după 15 minute. Se notează doza cea mai mică de alexină care a produs hemoliza completă.

Redăm schematic, în tabelul 41, titrarea alexinei.

Tabelul 41

Titrarea alexinei

Elemente	T U B U L								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
	Cantitatea în ml								
Alexină	0,1	0,13	0,16	0,19	0,22	0,25	0,28	0,31	—
Ser fiziologic	1,4	1,37	1,34	1,31	1,28	1,25	1,22	1,19	1,5
Sistem hemolitic	1	1	1	1	1	1	1	1	1

15 minute la baia de 37°C

În tubul „martor sistem" nu trebuie să se producă nici urmă de hemoliză. Titrarea alexinei se execută înainte de începerea reacţiei. Unii autori recomandă ca titrarea alexinei să se facă în sistem bacterian sau în complex, adică în prezenţa tuturor elementelor care intră în reacţie (înlocuind, bineînţeles, serul imun cu serul normal), căci astfel se obţin rezultate mai precise decît în sistemul de titrare indicat mai sus (sistem numit *per se*).

Prepararea sistemului hemolitic. Titrul serului hemolitic o dată cunoscut se trece la prepararea sistemului hemolitic.

În acest scop, se amestecă 1,25 ml de suspensie în ser fiziologic de globule roşii (depozit) cu 100 ml de diluţie în ser fiziologic de ser hemolitic. Serul hemolitic este diluat în aşa fel încît 1 ml să conţină patru doze minime hemolizante. Serul hemolitic nu se adaugă brut peste suspensia de globule roşii, ci diluat într-o cantitate de ser fizilogic aproximativ egală cu $^1/_2$ din volumul total al sistemului. De exemplu, pentru a obţine 1 000 ml de sistem se amestecă 12,5 ml de globule roşii depozit cu 487,5 ml de ser fiziologic, peste care se adaugă serul hemolitic diluat în 500 ml de ser fiziologic. Dacă titrul serului hemolitic este de 1/4 000, pentru prepararea a 1 000 ml de sistem se pune 1 ml de ser hemolitic în cei 500 ml de ser fiziologic.

După amestecarea perfectă prin agitare a acestor elemente, sistemul este pus la baia de 37°C pentru 45 de minute.

Titrarea puterii adsorbante de alexină sau anticomplementară a antigenului. Problema cea mai grea, în efectuarea reacţiei de fixare a complementului, este prepararea unui antigen convenabil. El nu trebuie să fixeze masiv alexina, dar, împreună cu anticorpul, să formeze complexe energic fixatoare faţă de acest element. Procedeul de preparare a antigenilor fixa-

Scanned with OKEN Scanner

tori variază de la un caz la altul. Un antigen, oricum ar fi preparat, trebuie examinat din punct de vedere al puterii sale anticomplementare şi acest examen se face în modul următor : se diluează antigenul, de exemplu, în diluţii de 1/5, 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50. Fiecare diluţie se repartizează în cîte şase tuburi, în fiecare tub punînd cîte 1 ml de soluţie. În fiecare serie de tuburi se repartizează alexina diluată 1/10 sau 1/15 în doze crescînde, începînd cu 0,05 şi sfîrşind cu 0,5 ml. În toate tuburile volumul lichidului se completează la 1,5 ml. Tuburile se agită şi se lasă 1 oră la 37°C, apoi se adaugă, în fiecare tub cîte 1 ml de sistem hemolitic. Tuburile se agită şi se pun la 37°C şi rezultatul se citeşte după ½ de oră. Pentru reacţia de fixare se foloseşte diluţia de antigen care nu a împiedicat hemoliza globulelor roşii nici în tubul în care se găseşte cea mai mică doză de alexină, 0,05 ml. Unii cercetători recomandă ca titrarea puterii anticomplementare să se facă în prezenţa serului normal, deoarece se obţin astfel rezultate mai bune.

Serul imun se poate prepara pe animale sau provine de la oameni sau animale la care vrem să precizăm, prin reacţia de fixare, natura unor infecţii bacteriene sau parazitare. Serul, ca şi antigenul, trebuie examinat înainte de folosire din punct de vedere al puterii sale anticomplementare.

Principial, reacţia de fixare a complementului constă din a amesteca, în doze convenabile, într-un prim timp :

— antigen
— anticorp
— alexină

După 30 de minute de contact, la 37°C, se adaugă sistemul hemolitic. Reacţia se citeşte după 15—20 de minute la 37°C şi este negativă cînd se produce hemoliza şi pozitivă cînd nu se produce hemoliza, cînd deci s-a constituit, în primul timp al reacţiei, complexul fixator de alexină.

OPSONIZAREA
(SENSIBILIZAREA ANTIGENILOR FAŢĂ DE FAGOCITE)

Primele observaţii privind acţiunea favorizantă a serurilor imune asupra fagocitozei germenilor patogeni au fost făcute, în 1895, de Denys şi Leclef. Aceşti autori, urmărind fagocitoza streptococilor, in vitro, constată că leucocitele devin mult mai active atunci cînd peste suspensia de globule albe şi streptococi se adaugă puţin ser antistreptococic. Constatări similare au fost făcute şi de alţi observatori, iar un studiu sistematic asupra fenomenului de opsonizare, adică de pregătire a celulei bacteriene în vederea înglobării ei de către fagocite, a fost făcut de Wright şi Douglas (1903). Aceşti autori constată că opsonizarea este datorită prezenţei, în serul imun, a unui principiu, numit de ei opsonină. O substanţă asemănătoare se găseşte, într-o mai mică măsură, şi în serurile normale [1] şi spre a deosebi opsoninele din serurile imune de cele din serurile

[1] Unii autori (Neufeld şi Rimpau, 1904, 1905) disting două substanţe cu activitate asemănătoare şi le numesc pe unele „tropine" şi pe altele „opsonine". Opsoninele se deosebesc de imunopsonine, tropine sau bacteriotropine prin următoarele proprietăţi :

1) opsoninele se găsesc în serul normal şi cu acţiune nespecifică ; bacteriotropinele sînt prezente în serul imun, sînt deci anticorpi şi acţionează specific ;

2) opsoninele sînt termolabile — se distrug la 56°C, iar bacteriotropinele rezistă, ca şi anticorpii de altfel, la această temperatură.

Scanned with OKEN Scanner

normale primele se mai numesc şi imunopsonine, tropine sau bacteriotropine.

Imunopsoninele, ca toţi anticorpii, acţionează în mod specific. Se constată, într-adevăr, că un ser antistreptococic favorizează numai fagocitoza streptococilor, iar unul antipneumococic numai pe a pneumococilor etc. Or, specificitatea de acţiune a opsoninelor nu se poate explica decît în cazul cînd ele influenţează bacteriile şi nu leucocitele, aşa cum presupuneau unii cercetători. Într-adevăr, ar fi greu de explicat cum un ser antistreptococic, de exemplu, poate, adresîndu-se leucocitelor, să mărească energia fagocitară a acestora numai faţă de streptococi. Dacă opsoninele dintr-un ser imun ar mări energia fagocitară a leucocitelor, atunci vaccinarea, cu o singură specie bacteriană, ar mări capacitatea defensivă a animalului vaccinat faţă de toate speciile bacteriene patogene. Or acest lucru nu se întîmplă. De altfel, s-a demonstrat experimental că leucocitele care au stat în contact cu un ser opsonizant nu sînt mai active ca leucocitele care nu au suferit un asemenea contact. În schimb, germenii absorb, în mod specific, opsoninele dintr-un ser şi capătă, prin acest contact, însuşiri care îi fac uşor fagocitabili. Între germenii care au stat în contact cu serul imun şi cei care au stat în contact cu un ser normal se constată diferenţe importante în ceea ce priveşte energia cu care sînt fagocitaţi. Primii sînt mult mai repede distruşi ca cei din a doua categorie. Raportul dintre numărul de germeni opsonizaţi şi fagocitaţi şi numărul de germeni neopsonizaţi şi fagocitaţi a fost numit indice opsonic. Cum există un raport între puterea opsonizantă a unui ser şi gradul de imunitate a organismului respectiv, faţă de germenul cercetat, se admite că indicele opsonic poate da indicaţii privind rezistenţa unui organism faţă de o specie bacteriană patogenă. Pentru a stabili indicele opsonic al unui ser imun sau al unui ser provenind de la un individ care suferă de o infecţie bacteriană, se procedează în felul următor: se recoltează sîngele într-un tub care conţine o soluţie 0,5 sau 1% citrat de sodiu în apă fiziologică (volumul de sînge recoltat trebuie să fie egal cu volumul de soluţie de citrat ce se găsea iniţial în tub); se separă, prin centrifugare, plasma de elementele figurate; se fac apoi două amestecuri în două tuburi diferite: într-un prim tub se pun leucocite, plasmă de la bolnav şi o suspensie din germenii infecţiei bănuite; în al doilea tub se pun aceleaşi elemente, înlocuind însă plasma bolnavului cu o plasmă de la un individ sănătos. Cele două amestecuri se pun la 37°C; după 15 sau 30 de minute se examinează frotiurile din cele două

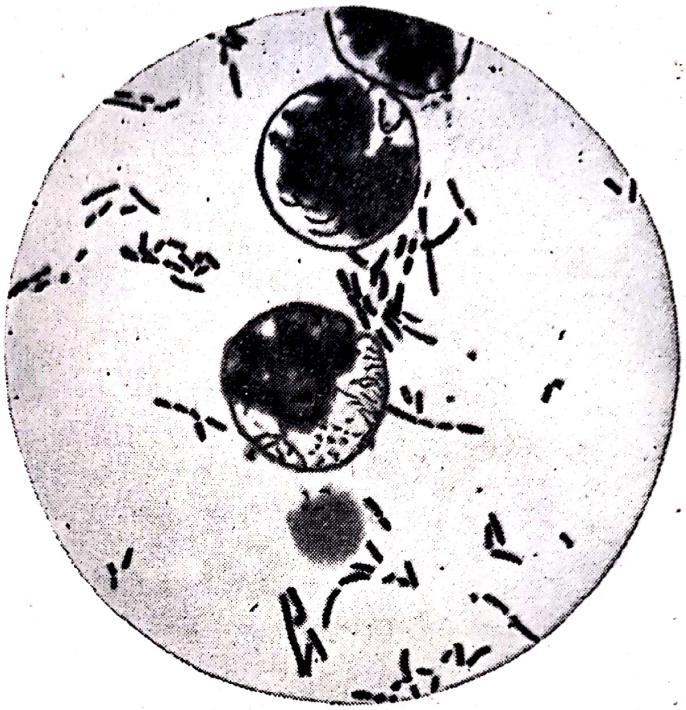


Fig. 52 — Fagocitoza nu se produce în prezenţa serului normal (bacilii difteriei) (după Neufeld)

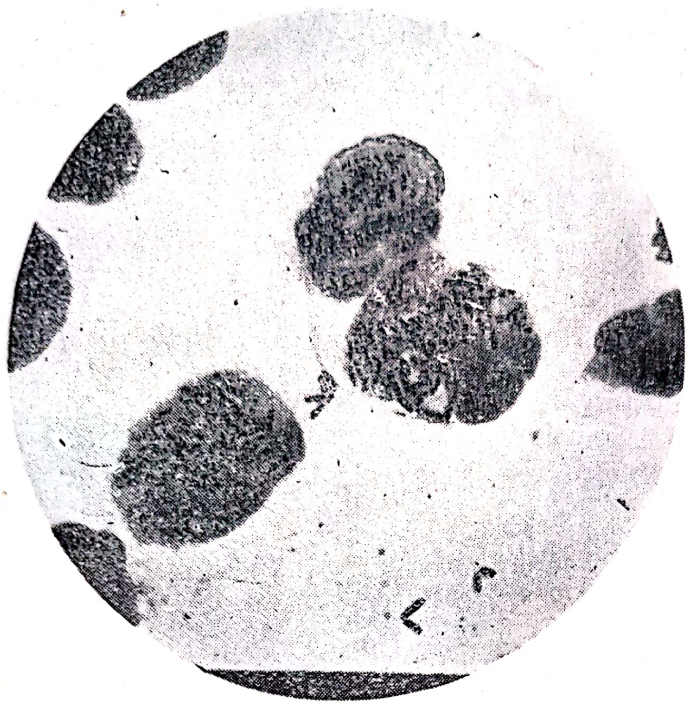


Fig. 53 — Fagocitoză activă în prezența serului imun (bacilii difteriei) (după **Neufeld**)

amestecuri și se determină numărul germenilor fagocitați, de 100—200 de leucocite, într-un amestec și în altul. Raportul dintre cele două cifre găsite constituie indicele opsonic. Cînd acest raport este egal sau mai mic ca unitatea, adică atunci cînd numărul germenilor fagocitați în prezența plasmei provenind de la bolnav, este egal sau mai mic decît numărul germenilor fagocitați în prezența plasmei normale, prognosticul este defavorabil. Un asemenea indice opsonic arată, într-adevăr, că serul bolnavului nu s-a îmbogățit în cursul infecției în opsonine, că organismul nu reacționează prin producere de anticorpi. Dimpotrivă, cînd acest raport este mai mare ca unitatea, atunci înseamnă că în serul bolnavului se găsesc opsonine care favorizează fagocitoza și deci distrugerea germenilor infecției. Concentrația opsoninelor în sînge este reglată de sistemul nervos așa cum au arătat H a d n a g y și colaboratorii (1953). Adrenalina ridică titrul opsonic al plasmei, iar pilocarpina îl scade. Efectul adrenalinei ca și al pilocrapinei poate fi înlocuit prin reflexe condiționate.

În ceea ce privește mecanismul acțiunii opsoninelor, s-a putut constata că germenii opsonizați aderă mai ușor de fagocite decît cei neopsonizați. B a r i k i n a imaginat o experiență care pune bine în evidență fenomenul de adeziune. Autorul observă, în primul rînd, că leucocitele aderă la suprafața unei plăci de sticlă așa de solid, încît un curent de apă fiziologică nu le poate dezlipi. Dacă, peste leucocitele deja fixate, se adaugă o suspensie de globule roșii, se poate ușor constata că acestea nu aderă nici la suprafața sticlei și nici nu se lipesc de leucocite. Globulele roșii aderă însă de leucocite dacă, în prealabil, au fost în contact cu un ser opsonizant. Această adeziune este așa de puternică încă spălarea lamei cu apă fiziologică nu le dezlipește.

Activitatea opsonizantă a unui ser se exercită în aceeași măsură față de germenii morți sau vii. Particulele inerte de amidon, cărbune, carmin devin ușor fagocitabile printr-un contact cu proteina serică. Este foarte probabil că aceste particule se îmbibă în ser cu materii proteice care le măresc capacitatea adezivă.

Opsonizarea diverselor particule rezultă, ca și hemoliza și bacterioloza din concursul a doi factori și anume anticorpul și alexina. Într-adevăr, un ser cu însușiri opsonizante pierde această însușire prin încălzire la 56°C timp de $^1/_2$ de oră, dar o recapătă prin adăugarea serului normal, deci a alexinei.

NEUTRALIZAREA TOXINELOR
(SENSIBILIZAREA TOXINELOR FAŢA DE FACTORII DESTRUCTIVI DIN ORGANISM)

Una din primele descoperiri, privind proprietăţile serurilor imune, o constituie inactivarea toxinelor bacteriene, in vivo (Behring, 1890) sau in vitro (Ehrlich, 1897).

Dovada neutralizării unei toxine se poate face, de multe ori, in vitro. Ehrlich (1897) a făcut în acest sens prima observaţie. El a constatat că serul imun paralizează activitatea coagulantă a ricinei asupra sîngelui de iepure. Majoritatea toxinelor animale, vegetale şi bacteriene conţin fracţiuni hemolitice a căror acţiune poate fi, de asemenea, neutralizată prin anticorpii specifici. Astfel filtratul stafilococilor toxigeni, de exemplu, hemolizează globulele roşii ale diverselor specii animale. Se poate uşor determina cantitatea de filtrat capabilă să hemolizeze 1 ml dintr-o suspensie 1% de globule roşii şi se poate preciza, in vitro, şi cantitatea de ser imun care poate neutraliza acest filtrat împiedicînd hemoliza.

Dovada neutralizării altor toxine cum sînt de exemplu toxinele difterice sau tetanice nu se poate face decît pe animalele de experienţă aşa cum au arătat Behring, precum şi Behring şi Kitasato. Serul imun antidifteric, de exemplu, injectat unui animal sensibil, îi conferă o stare de rezistenţă faţă de toxina difterică. Amestecat, în tuburi, cu toxina respectivă, serul răpeşte nocivitatea produsului toxic şi amestecul devine inofensiv pentru animalul de experienţă. Amestecînd, în tuburi, cantităţi fixe de toxină cu volume variabile de ser antitoxic şi după $^1/_4$ de oră inoculînd amestecul, din fiecare tub, la un animal sensibil se poate preciza cantitatea minimă de ser capabilă să neutralizeze un volum fix de toxină. Deoarece conţinutul în toxină variază, pentru aceeaşi specie bacteriană, de la un filtrat la altul se ia în consideraţie, pentru a determina valoarea neutralizantă a unui ser, nu volumul de toxină neutralizată, ci numărul de doze minime mortale, pentru animalul de experienţă, care au fost inactivate. Cu cît numărul de doze minime mortale neutralizate este mai mare, cu atît serul este mai activ.

In vivo sau in vitro se poate deci demonstra neutralizarea produsului toxic de către anticorpii care au luat naştere într-un organism prin injectarea acestui produs. Ceea ce constatăm, în mod regulat, în cursul acestor experienţe, este inactivarea acestor toxine. Cum se face această inactivare, care este mecanismul acestei neutralizări ?

Antitoxinele, după datele pe care le posedăm, au o acţiune directă asupra toxinelor. Această acţiune directă însă nu se traduce prin distrugerea toxinelor. Anticorpii nu distrug toxinele, ci ei fixîndu-se pe molecula toxică le izolează în interiorul organismului, făcîndu-le, în acelaşi timp, accesibile fagocitelor. Se constată, în acest sens, că un amestec de toxină — antitoxină, deşi se arată inofensiv cînd este injectat la un animal sensibil, conţine elementul toxic. Intr-adevăr, prin anumite procedee, toxina se poate separa din complexul anticorp — antigen, reluîndu-şi proprietăţile iniţiale şi, în primul rînd, toxicitatea. Primele experienţe privind separarea toxinei din complexul inactiv au fost făcute de Calmette. Autorul, plecînd de la constatarea că veninul şerpilor rezistă mai mult la căldură decît antitoxina respectivă, încălzeşte un complex dovedit inactiv la temperatura de 70—78°C. In aceste condiţii antitoxina se distruge, iar toxina se poate,

Scanned with OKEN Scanner

astfel, recupera aproape în întregime, cu toate proprietăţile sale iniţiale. După alţi autori, desfacerea toxinei din complexul anticorp-antigen se face mai complet cînd încălzirea se face în mediu uşor acid.

Ce legături există între neutralizarea unei toxine şi floculatul ce se formează cînd se amestecă antitoxina cu toxina respectivă? Precipitarea este un fenomen esenţial pentru neutralizarea toxinei? Precipitatul ce se formează rezultă din cuplarea toxinei cu antitoxina respectivă sau rezultă din precipitarea altor materii antigenice din filtratul microbian de către anticorpii respectivi? Rezultatele obţinute, de diferiţi cercetători, arată că precipitatul nu este constituit numai din toxină şi antitoxină. Este drept că floculatul ce se formează atunci cînd se amestecă toxina cu antitoxina conţine elementul toxic, dar acesta pare a fi înglobat în precipitat, dar nu face parte integrantă din el. Primele dovezi, care sprijină această ipoteză, se găsesc în experienţele lui R a m o n, din care reiese că nu totdeauna există un paralelism perfect între floculare şi neutralizarea toxinei. Chiar şi pentru toxina difterică, la care precipitarea şi neutralizarea merg, în majoritatea cazurilor, paralel, s-au pus în evidenţă unele neconcordanţe. Seruri care, pe baza floculării, erau clasate ca foarte active, se comportau, in vivo, ca seruri slab sau mediocru neutralizante. Aceasta ne arată că în filtratul bacterian injectat, în vederea obţinerii serului, erau, pe lîngă toxină, şi alţi antigeni. Între aceşti antigeni, care sînt tot de natură bacteriană, şi toxină există un raport cantitativ care se răsfrînge şi asupra anticorpilor care iau naştere în organism, în sensul că de regulă un ser care este bogat în precipitine conţine şi cantităţi însemnate de antitoxine.

În acelaşi sens, se constată că un exces de ser antitoxic împiedică precipitarea, dar nu neutralizarea toxinei. Toxina deci poate fi inactivată în afara formării oricărui precipitat. Acest fapt este de acord cu constatarea că pseudoglobulinele, separate dintr-un ser antitoxic, neutralizează toxina respectivă, deşi nu o mai precipită. Precipitarea apare deci ca un fenomen secundar. In vivo, fenomenul nu este lipsit însă de semnificaţie. Astfel, se pare că formarea precipitatului care înglobează toxina împiedică contactul dintre toxină şi celulele sensibile; în plus, sub această formă, toxina este mai uşor înglobată de celulele sistemului reticuloendotelial.

NEUTRALIZAREA VIRUSURILOR

Cercetări deja vechi au dovedit că un amestec de ser imun şi virus devine, după un contact de 1 oră sau mai mult, inactiv. S-a tras de aici concluzia că serul imun are proprietăţi virulicide şi că acţionează asupra virusului ca o substanţă antispetică oarecare, adică distruge iremediabil virusul.

Cercetarea mai îndeaproape a acestor fenomene a arătat însă că substanţele antivirus, din serurile imune, ca şi substanţele antibacteriene şi antitoxice din serurile imune respective nu distrug virusul, dar îl împiedică să-şi exercite prerogativele sale de patogenitate. Virusul, prin contactul cu serul imun, nu este distrus, dar prezenţa serului imun îl împiedică să producă infecţia. Serul imun este antivirulent, dar nu virulicid; el neutralizează virusul, inactivează activitatea sa patogenă, dar nu-i modifică proprietăţile sale esenţiale.

Experienţe numeroase au dovedit, într-adevăr, că într-un amestec apatogen, neutral, de ser şi virus, acesta din urmă se găseşte sub forma sa

activă. În acest sens, s-a observat, de exemplu, că un amestec de ser imun şi virus, inactiv pe o cale de inculare este patogen pe altă cale. Astfel, amestecuri de ser şi virus vaccinal, care nu au produs leziunea specifică pe cale intradermică, o provoacă cînd sînt injectate pe cale intravenoasă, intratesticulară sau intracerebrală (Andrewes, 1928, Vieuchange, 1938). Serul împiedică infecţia celulelor dermice, dar nu pe a celor nervoase sau testiculare, care au o afinitate mai mare pentru virus. Acelaşi lucru se întîmplă şi în cazul cînd amestecul de ser şi virus vaccinal, inactiv pentru pielea iepurelui, este însămînţat într-o suspensie de celule vii (Vieuchange şi Stamatin, 1938) sau pe membrana corioalantoidiană a embrionului de găină) Keogh, 1936, Burnet şi col. 1937, Vieuchange şi Mesrobeanu, 1938). De altfel, chiar prin simpla diluare, un amestec de ser imun şi virus herpetic inactiv devine activ (Bedson, 1928). Extractul testicular face activ pentru piele un amestec de ser şi virus vaccinal, dovedit inactiv pentru acest ţesut. (Vieuchange, 1938). Pe de altă parte, virusul fiind constituit din particule mai mari decît globulina-anticorp, el a putut fi separat de anticorpi prin filtrare (Chamberland L_2), ultrafiltrare sau ultracentrifugare, constatîndu-se şi în acest caz că virusul obţinut dintr-un amestec inactiv îşi recapătă, calitativ şi cantitativ, proprietăţile iniţiale (Andrewes, 1928). Precipitînd globulinele-anticorp, prin CO_2, din amestecurile ser-virus neutre, virusul rămîne în soluţie şi poate produce infecţia caracteristică (Andrewes, 1928). Folosind capacitatea adsorbantă a diferitelor substraturi (caolin, cărbune animal), Andrewes (1928) a separat virusul vaccinal, iar N. Stamatin (1939) virusul variolei ovine, din amestecuri care se dovedeşră inactive, prin injecţii intradermice la animale sensibile. În acelaşi sens, Tovarniţki (1948) observă că din amestecul neutru virusul gripei-anticorp, virusul se poate desprinde şi fixa pe papaină (ferment), care are o afinitate mai mare pentru virus decît anticorpul. Complexul virus-papaină precipită în apă, dar se solubilieză în soluţie 3% de ClNa. Virusul poate fi desprins de complexul virus-papaină şi el îşi recapătă, în acest caz, toate proprietăţile sale iniţiale. Virusul, sub forma sa activă (virusul poliomieli-

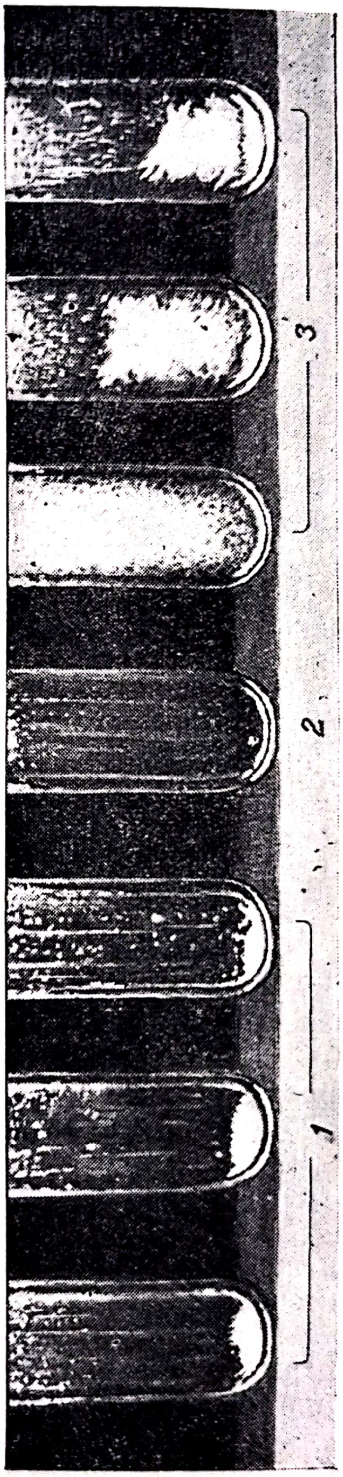


Fig. 54 — Precipitarea virusurilor prin seruri precipitante
1 — virusul Bushy Stunt; 2 — tub martor; 3 — virusul mozaicului tutunului

tei, virusul vaccinal), a putut fi separat din amestecul neutru ser-virus şi prin cataforeză (Olitski şi col., 1929, Lépine, 1930.) Un contact prelungit (24 de zile) între ser şi virus nu duce la inactivarea virusului. Prelungirea timpului de contact dintre ser şi virus ar duce, după Keogh, 1936, la o reducere a activităţii patogene a virusului, dar nu se poate preciza dacă această reducere se datoreşte, în totalitatea sa, acţiunii anticorpilor. Andrewes (1930), de altfel, nu a observat, în toate cazurile, o reducere a activităţii unui virus care a stat timp destul de lung (4 zile sau mai mult) în contact cu serul imun respectiv. Anticorpii par totuşi că se fixează pe particulele virulente. Smith Wilson (1930) constată, în acest sens, că serurile antivaccinale şi antiherpetice pierd capacitatea lor neutralizantă prin contactul cu virusurile respective (ţesut testicular virulent).

Virusul nu este deci distrus de anticorpi şi legătura dintre anticorpi şi particulele virulente în amestecuri neutre este destul de labilă. Ne putem întreba de ce, în anumite condiţii, virusul nu este totuşi patogen în prezenţa serului? Cum împiedică anticorpii dezvoltarea infecţiei? Această problemă nu a fost încă complet lămurită, dar faptele experimentale obţinute, în această direcţie, permit să se formuleze două ipoteze. O primă ipoteză admite că particula virulentă, sub influenţa anticorpului, suferă modificări care o fac mai sensibilă faţă de factorii litici şi celulari ai organismului. Astfel leucocitele îşi măresc, după unii observatori, capacitatea lor fagocitară, faţă de virus, în prezenţa serului. Numeroase cercetări atestă, de altfel, că, chiar în afara oricărei stări de imunitate dobîndită, leucocitele fixează virusul. A doua ipoteză, în sprijinul căreia se grupează numeroase date experimentale, admite că serul împiedică pătrunderea virusului în celula sensibilă. Se constată, în acest sens, că, în culturi de ţesuturi sau în embrioni de găină, virusurile nu se multiplică dacă mediilor respective li s-a adăugat în prealabil sau o dată cu virusul ser imun (Andrewes, 1930). La fel, printr-o inoculare intradermică de ser imun se conferă o stare de imunitate regiunii respective (Andrewes, 1929). Virusul vaccinal injectat, de exemplu, împreună cu serul imun respectiv, nu produce leziunea caracteristică. Aceste rezultate nu se obţin dacă serul imun a fost adăugat în mediu sau injectat în piele după administrarea virusului (Andrewes, 1929). Se pare că, o dată pătruns în celule, virusul nu mai poate fi influenţat de serul imun. Această constatare este de acord cu observaţii numeroase făcute în clinică şi după care valoarea terapeutică a serurilor antivirus este foarte redusă şi chiar nulă, în timp ce valoarea preventivă este importantă în aproape toate virozele. In acelaşi sens se mai constată că injecţia serului imun la un animal la care leziunile produse de virus sînt incipiente duce la oprirea dezvoltării şi întinderea leziunilor. Astfel, leziunile variolice incipiente nu-şi mai amplifică dimensiunile în urma administrării serului imun. Serul imun, în acest caz, nu produce vindecarea leziunilor constituite, dar împiedică pătrunderea virusului în alte celule şi deci întinderea leziunilor. Inhibarea hemoaglutinării prin anticorpi sprijină această din urmă ipoteză şi aduce şi unele date privind mecanismul de acţiune a anticorpilor. Se ştie că unele virusuri se fixează pe globulele roşii ale unor specii animale şi le aglutinează (fenomenul Hirst) şi se mai ştie că această aglutinare nu se mai produce în cazul cînd virusul a stat în contact cu anticorpii respectivi. Acest fapt ne arată că prin cuplarea virusului cu anticorpii s-a luat virusului posibilita-

Scanned with OKEN Scanner

tea de a se fixa pe globulele roşii. În consecinţă, s-ar putea admite că anticorpii împiedică pătrunderea virusurilor în celule, prin aceea că împiedică fixarea lor pe suprafaţa celulelor sensibile.

ACTIVITATEA CITOTOXICĂ

Anticorpii, în prezenţa alexinei, sînt capabili să producă efecte nocive nu numai asupra celulelor bacteriene sau globulelor roşii, ci şi asupra altor celule. Încă din 1899, Mecinikov obţine, de exemplu, seruri leucotoxice prin injecţia globulelor albe ale unei specii animale altei specii. Anticorpii dintr-un asemenea ser aglutinează şi dizolvă protoplasma leucocitelor, dar nu nucleii lor. Ca şi serurile hemolitice sau bacteriolitice, serul leucotoxic încălzit, sensibilizează globulele albe, dar nu le lizează. Liza este produsă deci de alexină.

Plachetele sanguine ale unei specii, la fel, produc, în organismul altei specii, anticorpi cu proprietăţi litice. Un asemenea ser, injectat la un animal aparţinînd speciei care a furnizat plachetele, produce o topire a acestor elemente in vivo şi, în aceste condiţii, coagularea sîngelui nu se mai face în mod normal.

Seruri organotoxice se pot obţine faţă de diverse organe ale animalului cum sînt ficatul, rinichii (Nefediev, 1901), glandele cu secreţie internă etc. Injecţia unor asemenea seruri, la animale din specia care a furnizat antigenul, provoacă tulburări mai mult sau mai puţin grave. Un ser preparat pe iepure, cu rinichi de cobai, poate produce la cobai o nefrită gravă. Un ser antihepatic provoacă necroza şi degenerarea acestui organ. Aceste tulburări anatomice sînt însoţite de eliminarea leuciniei, tirozinei şi zahărului prin urină. Serul antipancreatic provoacă un diabet de lungă durată. În fine, serurile obţinute prin injectarea glandelor cu secreţie internă sînt antihormonale, adică împiedică efectul normal al hormonilor secretaţi de aceste glande.

Rezultate interesante s-au obţinut prin injectarea spermei diverselor animale de altă specie sau chiar aparţinînd aceleiaşi specii. Mecinikov a arătat, încă din 1900, că sperma conţine materii antigenice chiar pentru animalul de la care provine. Astfel, sperma recoltată de la un cobai şi injectată subcutanat sau intraperitoneal la acelaşi animal provoacă apariţia anticorpilor spermotoxici. În serul imun propriu, spermatozoizii pierd repede mobilitatea şi mor; injectaţi, pe cale intraperitoneală la un animal al cărui ser conţine anticorpi spermotoxici, spermatozoizii devin la fel imobili şi mor; fagocitele intervin în faza finală a procesului, înglobînd spermatozoizii morţi. Dimpotrivă, la un cobai normal spermatozoizii îşi păstrează, în cavitatea peritoneală, mobilitatea şi vitalitatea timp de cîteva ore. Cobăiţele imunizate cu spermatozoizii de cobai nu devin însă sterile, deoarece în vaginul lor spermatozoizii rămîn vii şi mobili.

Bogomoleţ a dat o aplicaţie practică acestor constatări, preparînd serul antireticular-citotoxic care s-a dovedit a fi un excitant puternic al ţesutului conjunctiv.

Ţesutul conjunctiv, în concepţia lui Bogomoleţ, are multiple funcţiuni în organism. El îndeplineşte, astfel, funcţiuni trofice (regulatoare ale oxidărilor celulare şi de înmagazinare a materiilor nutritive), plastice (de reparaţie a ţesuturilor lezate) şi de apărare (fagocitoza, fabricare de anti-

corpi). Deficienţele ţesutului conjunctiv se traduc, în consecinţă, prin tulburări trofice, plastice sau defensive. Aceste deficienţe pot fi remediate, după Bogomoleţ, prin serul reticular citotoxic, care în doze convenabile nu funcţionează ca un toxic, ci ca un excitant al ţesutului conjunctiv.

Prepararea serului activ pentru om. Serul se prepară pe cal. Antigenul, după Martşuk, este constituit din 2 părţi de măduvă sternală şi 8 părţi de splină. Aceste materiale se recoltează din cadavrele umane la cel mai tîrziu 10 ore după moarte. (Moartea nu trebuie să fie datorită unei boli infecţioase). Amestecul de măduvă osoasă şi splină se spală cu ser fiziologic pentru a îndepărta sîngele, se triturează fin cu nisip şi apoi se adaugă 2—5 volume de apă fiziologică. Amestecul se debarasează de particulele prea mari şi de grăsime fie prin decantare, fie printr-o scurtă centrifugare (1 minut la 1 000 de turaţii) şi lichidul rezultat se injectează la cal în doze variind de la 30 la 50 ml, la interval de 1 săptămînă; numărul injecţiilor poate ajunge pînă la 100. Antigenul se păstrează la rece un timp limitat — cel mult 6 săptămîni. 8—9 zile după ultima injecţie animalul este sîngerat; serul se titrează, determinîndu-se puterea sa fixatoare de complement în prezenţa antigenului folosit. Doza minimă fixatoare de ser trebuie să fie de cel puţin 1/100 ml.

În scop terapeutic serul se administrează în doze mici, 0,05—0,30 pentru adulţi şi 0,01—0,1 pentru copii (serul este diluat 1/10 cu apă fiziologică). Injecţiile se repetă la intervale de 3 zile. Se pot face mai multe serii de injecţii.

Serul se aplică în infecţii microbiene, cancer etc. Rezultate evidente se obţin în accelerarea puterii reparatoare a ţesuturilor. Loiseleur şi Zajdela (1949) observă, în acest sens, că un ser antireticular citotoxic preparat pe iepure cu antigen obţinut de la şoarece grăbeşte cicatrizarea unor plăgi cutanate create experimental.

Serul Bogomoleţ a găsit aplicaţii şi în medicina veterinară şi zootehnie. La animale, el a fost folosit în unele stări patologice, dar mai ales în scopuri economice. Serul citotoxic administrat de pildă oilor duce la o mărire a productivităţii lor în lînă.

La noi în ţară, V. Tomescu şi colaboratorii au preparat pe oaie un ser activ pentru cal, aplicîndu-l în diverse afecţiuni ale cabalinelor.

NEUTRALIZAREA FERMENŢILOR

Orice substanţă antigenică provoacă, in vivo, apariţia anticorpilor. Manifestările anticorpului sînt variate şi, în general, potrivite naturii antigenului. O toxină bacteriană va produce o antitoxină. Unele bacterii dau naştere la anticorpi litici.

Fermenţii bacterieni pot şi ei da naştere la anticorpi care inhibă unele funcţiuni ale bacteriilor. În acest sens, se citează faptul că unele specii bacteriene pigmentate nu secretă pigmentul propriu în medii cu ser imun. Stafilococul auriu, bacilul piocianic se comportă în acest fel pe medii care conţin serul imun respectiv. Fermenţii gelatinolitici sau zaharolitici pot fi inhibaţi de către serurile imune. Pneumococii cultivaţi în medii cu ser antipneumococic nu mai formează acid formic şi acetic din cauză că fermenţii respectivi sînt inhibaţi. Aceste diverse manifestări ale serurilor imune sînt cunoscute sub numele de acţiune antiblastică.

Scanned with OKEN Scanner

NEUTRALIZAREA ANTICORPILOR PRIN ANTIANTICORPI

Jules Bordet

Anticorpii, prin natura lor chimică, sînt materii antigenice şi produc anticorpi cînd sînt injectaţi la un animal de altă specie decît aceea care i-a furnizat. De exemplu, serul de cal care conţine o antitoxină, injectat la iepure, va da naştere la anticorpi. Aceşti anticorpi vor precipita proteina serică de cal şi, în acelaşi timp, vor neutraliza principii antitoxici. S-a presupus, de către unii cercetători, că în acest caz nu este vorba de o neutralizare a antitoxinelor, ci numai de antrenarea lor din soluţie de către precipitatul ce se formează sub influenţa serului precipitant antical. Experienţele privind neutralizarea sensibilizatricei hemolitice nu par să confirme acest punct de vedere. **Bordet** a arătat, în acest sens, că acest anticorp poate fi neutralizat chiar dacă el s-a fixat pe globula roşie respectivă. Autorul, pentru a demonstra această afirmaţie, amestecă globulele roşii de bou cu ser antibou preparat pe iepure. După ½ de oră de contact, separă globulele roşii de lichidul sensibilizant. Globulele roşii sensibilizate care au fixat hemolizinele din serul de iepure sînt puse în suspensie şi apoi sînt amestecate cu puţin ser de cobai care conţine anticorpi precipitanţi pentru serul de iepure hemolitic pentru globulele roşii de bou; cobaiul a fost injectat, în prealabil, cu un asemenea ser de iepure. Globulele roşii sensibilizate prin contact cu acest ser nu se mai hemolizează în prezenţa alexinei. Anticorpii din serul de cobai au desensibilizat deci globulele roşii de bou şi s-au adresat, în acest caz, tocmai sensibilizatricei pe care au inactivat-o. Deci în serul acestui cobai există un anticorp neutralizant faţă de anticorpul hemolitic.

Problema neutralizării anticorpilor prin alţi anticorpi poate îmbrăca şi alte aspecte de un interes practic imediat. Într-adevăr, s-a putut dovedi, în unele cazuri, că injectarea repetată a aceluiaşi ser imun la un animal nu se mai traduce, după cîteva injecţii, prin aceeaşi capacitate protectoare pe care o avea la început. Valoarea sa protectoare scade, ceea ce pare a se datora neutralizării anticorpilor din serul imun prin antianticorpii formaţi în urma injecţiilor repetate ale unui ser imun provenind de la aceeaşi specie animală.

Scanned with OKEN Scanner

INHIBAREA HEMOAGLUTINĂRII

Globulele roşii ale diverselor specii animale pot fi aglutinate de un virus, aşa cum s-a arătat mai sus. Acţiunea aglutinantă a virusului poate fi inhibată, în mod specific, prin anticorpii respectivi. Virusul cuplat cu anticorpul nu mai produce, într-adevăr, hemoaglutinarea. Această constatare a găsit, în primul rînd, aplicaţii în diagnosticul virozelor produse de virusuri cu hemoaglutinare pozitivă. Iată cum se procedează, de exemplu, pentru diagnosticul gripei umane: se recoltează de la bolnavul suspect de gripă două probe de ser — una la începutul bolii, alta cîteva zile mai tîrziu. Serul de la fiecare recoltare se distribuie, în doze descrescînde, începînd cu diluţia 1/40, în două serii de tuburi. In prima serie de tuburi se pune virusul gripei A, în alta virusul gripei B, cîte 0,5 ml de lichid alantoamniotic virulent. După 10 minute de contact se distribuie, în toate tuburile, cîte 0,5 ml de suspensie de globule roşii de găină. Citirea reacţiei se face după 90 de minute; rezultatul este pozitiv şi omul este infectat cu virusul gripei cînd serul de la a doua recoltă inhibă hemoaglutinarea cu cel puţin două diluţii de ser mai mult ca serul de la prima recoltă.

La păsări, reacţia de inhibare a hemoaglutinării prin ser este folosită, în laboratoare sau chiar şi pe teren, în diagnosticul pestei aviare; serul unei păsări bolnave de pestă sau pseudopestă aviară sau trecută recent prin boală inhibă, într-adevăr, aglutinarea globulelor roşii prin virusul pestei sau pseudopestei. Osten şi Andersen (1948) urmărind paralel cu reacţia de inhibare a aglutinării, capacitatea neutralizantă a serului păsărilor faţă de virusul pestei, in vivo, constată un paralelism între cele două reacţii. Astfel, după autori, titrul neutralizant al serului unei păsări normale este de 10 doze pe 1 ml (1 ml de ser neutralizează 10 d.l.m. de virus), în timp ce la o pasăre, în a 9-a zi de boală, acest titru atinge cifra de 100 000 de doze neutralizante d.l.m. Titrul de inhibare este şi el de 1/5 la pasărea normală şi de 1/320 la cea trecută prin pestă. In practică, inhibarea aglutinării la o diluţie de ser de cel puţin 1/80 sau un titru de neutralizare de 1 000 de doze pe 1 ml trebuie socotite ca reacţii pozitive, în sensul că serul respectiv provine de la o pasăre bolnavă sau trecută prin pestă.

Relaţiile dintre titrul inhibant al hemoaglutinării (I.H.A.) din serul unei păsări şi rezistenţa pasării respective au fost cercetate şi de I. Suhaci şi colaboratorii (1952). Autorii ajung la concluzia că anticorpii inhibitori ai hemoaglutinării dispar mai repede ca imunitatea şi că păsări cu titrul inhibitor negativ rezistă la o infecţie severă de control. In acelaşi sens, Surdan şi colaboratorii constată că unele seruri antipestoase inhibă hemoaglutinarea la un titru ridicat, dar sînt slab protectoare. Nu există, după aceste date, în toate cazurile, un paralelism între imunitate şi anticorpii inhibitori ai hemoaglutinării care circulă în umori.

Scanned with OKEN Scanner

STĂRILE ALERGICE
(MODIFICĂRILE SUFERITE DE ORGANISMUL ANIMAL ÎN PREZENȚA ANTICORPILOR)

Organismul animal capătă, prin contactul cu substanțele antigenice, unele funcțiuni noi și care sînt datorite prezenței în umori și celule a anticorpilor formați sub influența antigenului. Anticorpii, prin modificările pe care le impun antigenului, îndeplinesc, de cele mai multe ori, funcțiuni profilactice, adică de apărare a organismului față de acțiunea nocivă a antigenilor. Astfel, inactivînd toxinele bacteriene sau de altă natură, sensibilizînd bacteriile față de acțiunea litică a alexinei sau față de fagocite, împiedicînd pătrunderea virusurilor în celule etc., ei apără organismul care îi conține față de aceste elemente nocive.

Constituirea, in vivo, a complexului antigen-anticorp poate constitui însă, uneori, nu un mijloc de apărare, ci un izvor de tulburări organice. Behring, în 1895, observă, în acest sens, că unii din caii folosiți la prepararea serului antidifteric sau antitetanic prezintă reacții exagerate în urma reinoculării toxinelor respective, în doze inofensive chiar pentru martori. Acest fel de manifestări au fost numite de autor reacții paradoxale sau de suprasensibilitate. Un fenomen asemănător a fost observat, în 1902, de Portier și Richet cu ocazia studiului, pe cîini, a unei toxine obținute din tentaculele unor actinii. Întrebuințarea serurilor de cal în combaterea bolilor infecțioase ale omului a dus la descoperirea altor procese de sensibilitate exagerată, care sînt o consecință a contactului unui organism cu un antigen. Pirquet și Schick descriu, în 1905, în acest sens, complicațiile pe care serul de cal le poate produce la om.

Pirquet apropie între ele toate procesele de sensibilitate exagerată, anormală, care se instalează într-un organism ca urmare a unui contact cu un antigen, desemnîndu-le cu termenul unic de alergie, cuvînt de origine greacă care înseamnă alt mod de reacție (ἄλλησρεια). În urma acestor lucrări de bază, majoritatea cercetătorilor consideră ca reacție alergică orice modificare specifică a modului de reacție a unui organism față de o substanță antigenică cu care organismul respectiv a mai fost în contact, modificare de reacție care se manifestă printr-o creștere și nu o reducere a sensibilității față de antigenul respectiv. În cadrul acestei defini-

ţii vom examina ca procese alergice distincte, anafilaxia, boala serului, idiosincraziile, alergiile infecţioase, autoalergiile şi paraalergiile. Toate aceste procese au o cauzalitate comună, fac parte din manifestările alergice, dar ele se disting prin unele particularităţi şi de aceea am socotit necesar să le studiem pe fiecare în parte.

ANAFILAXIA

Anafilaxia — fără protecţie — termen creat de Portier şi Richet (1902) şi opus profilaxiei — protecţie, garantare — desemnează o stare de hipersensibilitate conferită unui organism printr-o primă injecţie de antigen. Tulburările datorite stării de sensibilitate mărită spre deosebire de alte stări alergice apar, în acest caz, imediat după pătrunderea antigenului.

Primele observaţii privind fenomenele anafilactice au fost făcute de Portier şi Richet, în 1902, cu ocazia studiului unei toxine animale obţinute din tentaculele unor specii de actinii. Această toxină, injectată la ciine, pe cale intravenoasă şi în doze convenabile, produce o intoxicaţie mortală în 2—3 zile. Animalele moarte prezintă la autopsie o congestie intensă a organelor interne, în special a intestinului subţire, ceea ce a făcut pe autori să dea toxinei numele de actinocongestină. Aceste observaţii nu prezentau un interes deosebit. Cercetătorii observă însă mai departe un fapt important şi complet necunoscut la acea dată şi anume că un cîine care a suportat o primă injecţie de actinocongestină îşi modifică modul de reacţie faţă de această otravă. Într-adevăr, reinjecţia substanţei la un animal produce, în cîteva minute, tulburări de o gravitate excepţională şi diferite total de cele ce se produc în cazul primei injecţii: animalul reinjectat prezintă crampe, vomitează, are diaree şi tulburări respiratorii şi uneori moare în scurt timp, ceea ce nu se întîmplă în cazul primei injecţii. Animalele care nu mor se remit, în schimb, repede şi nu mai prezintă, ulterior, tulburările caracteristice intoxicaţiei cu actinocongestină. Ar reieşi de aici că un cîine care a suportat o primă injecţie de actinocongestină este rezistent faţă de toxină, dar el are o stare de hipersensibilitate faţă de anumiţi componenţi din materia toxică.

Natura substanţelor sensibilizante. Reacţii anafilactice nu se produc numai în cazul folosirii unor substanţe dotate cu proprietăţi toxice manifeste, cum era actinocongestina, ci şi în cazul reinoculării unor complecşi bine suportaţi de animale într-o primă injecţie. Un astfel de complex este, de exemplu, serul de cal, pentru iepure. Arthus (1903) observă, într-adevăr, că acest animal suportă, fără reacţii manifeste, o primă injecţie subcutanată de ser de cal, dar că o a doua injecţie, la acelaşi animal, pe aceeaşi cale şi cu acelaşi produs, provoacă o reacţie inflamatorie gravă urmată de cianoză şi, eventual, necroza pielii. Un animal sensibilizat faţă de serul de cal, inoculat 12 zile mai tîrziu cu acelaşi produs, pe cale intravenoasă, reacţionează ca şi cîinii reinjectaţi cu actinocongestină. Serul de cal sensibilizează deci iepurele, aşa cum actinocongestina sensibilizează cîinele. Arthus arată că laptele are aceeaşi valoare sensibilizantă ca şi serul de cal.

Scanned with OKEN Scanner

Un pas important în studiul anafilaxiei a fost făcut prin descoperirea sensibilității particulare a cobaiului față de reinjecția serului de cal sau a altor produse anafilactizante (Teobald Smith, Rosenau și Anderson, Otto, 1906). În urma acestor constatări, cobaiul a devenit animalul de experiență cel mai folosit pentru asemenea cercetări.

În general, substanțele capabile să sensibilizeze animalele sînt de natură proteică și au cele mai variate origini. Proteinele animale ca serul sanguin, albușul de ou, laptele, proteine vegetale, ca globulinele din boabele de ricin, zeina din boabele de porumb, celule animale, ca globule roșii, globule albe, spermatozoizii etc., celulele vegetale ca bacterii, diverse extrase bacteriene ca proteinele bacilului tuberculozei etc. au însușiri anafilactizante.

Substanțele anafilactizante sînt complecși antigenici. Factorii care răpesc unui complex funcțiunile antigenice îi răpesc și proprietățile anafilactizante. Haptenele nu sensibilizează, după cum nu pot produce nici anticorpi, dar provoacă reacții anafilactice la animalele sensibilizate cu antigeni completi din care s-au separat, după cum reacționează în vitro cu anticorpii pe care antigenii completi respectivi i-au produs în organismul animal. Astfel, polizaharidele extrase din pneumococi, streptococi, bacilii cărbunelui etc. nu sensibilizează animalele, dar provoacă reacții anafilactice la animalele sensibilizate cu antigenii completi respectivi.

Doza sensibilizantă. Dozele de antigen necesare sensibilizării unui animal sînt mici; cobaiul se sensibilizează, în condiții optime, față de serul de cal, cu o doză de 0,001 ml; dozele de 1 000 de ori mai mici sînt încă active; dozele mai mari de 0,001 ml sensibilizează, dar nu dau totdeauna rezultate pozitive, ele putînd avea un efect inhibitor. Ovoalbumina este sensibilizantă, pentru cobai, chiar în doză de 1/20 000 000.

Sensibilizarea pasivă, prin ser. Animalele cu o sensibilitate anafilactică față de o substanță oarecare conțin, în serul lor sanguin, anticorpii răspunzători de această sensibilitate. Existența acestor anticorpi anafilactizanți, numiți și reagine, poate fi demonstrată experimental. Astfel, serul unor animale sensibile transmite această stare la animale normale de aceeași specie — transmiterea homoloagă — sau de altă specie — transmitere heterologă. Acest din urmă fel de transmitere dă cele mai bune rezultate. Sensibilitatea anafilactică poate fi deci transmisă pasiv și există o anafilaxie pasivă sau activă, după cum există și o imunitate activă sau pasivă. Anafilaxia pasivă se instalează scurt timp după injectarea serului — cîteva ore — dar nu imediat.

Injecția preparantă. Injecția antigenului, în vederea sensibilizării active a unui animal, se numește preparantă și se face pe cale parenterală: subcutanată, intraperitoneală, intravenoasă etc. Calea digestivă este improprie; totuși, o permeabilizare a peretelui tubului digestiv permite sensibilizarea și pe această cale. Experimntal, serul de cal administrat pe cale bucală împreună cu bilă de bou sau cu substanțe dure, capabile să lezioneze mucoasa digestivă, poate sensibiliza cobaiul.

Viteza de sensibilizare. Starea de sensibilitate nu se instalează imediat după injecția substanței sensibilizante, ci numai după o perioadă de timp de minimum 6—8 zile. Cu cît doza de alergen este mai mare cu atît sensibilitatea se instalează mai tîrziu după injecția preparantă. Repetarea injecțiilor la intervale scurte — 2—3 zile — împiedică instalarea sensibili-

tăţii, deoarece aceasta nu este sezisabilă decît după dispariţia antigenului din organism.

Injecţia provocantă. Organismele sensibilizate activ sau pasiv reacţionează brutal şi imediat la injectarea substanţei pentru care sînt anafilactizate. Această injecţie numită *de probă* sau *provocantă* se face tot pe cale parenterală. Doza activă şi efectul obţinut depind, în cea mai mare măsură, de calea de inoculare. Calea subcutanată necesită doze mari de antigen, iar tulburările sînt, de obicei, de ordin local. Cobaii mor, într-un procent redus, chiar pe această cale. Iepurii nu mor niciodată; ei, ca şi cobaii de altfel, prezintă la locul de inoculare un edem, infiltrat cu globule roşii şi albe, urmat de cianoză şi chiar necroză locală a pielii (inflamaţia hiperergică). Acest tip de reacţie, numit încă şi şoc anafilactic local, este cunoscut sub numele de fenomenul Arthus. Injecţia pe cale intraperitoneală este mai severă ca cea subcutanată: cobaii sensibilizaţi cu ser de cal şi injectaţi, de probă, pe această din urmă cale, cu 5 ml de ser, mor în proporţie de 25—50%. Pe cale cerebrală, dozele de 0,5 ml de ser de cal omoară cobaii sensibilizaţi, faţă de acest produs, într-o proporţie de 100%. Calea intravenoasă este şi ea foarte severă; ea pune brusc în contact întregul organism cu substanţele pentru care el este sensibil. Simptomele apar imediat, chiar înainte de a sfîrşi injecţia; ele sînt de o gravitate excepţională şi, la cobai, provoacă regulat moartea. Doza activă, pe această cale, pentru serul de cal şi la cobai este de 0,1—0,5 ml.

ŞOCUL ANAFILACTIC

Reinjecţia substanţei sensibilizante provoacă o stare patologică numită de Besredka *şoc anafilactic*. Şocul poate avea o evoluţie locală, cînd simptomele se limitează la locul reinjecţiei — şocul local (fenomenul Arthus) — sau generală, cînd simptomele cuprind întregul organism — şocul anafilactic general sau, simplu, şocul anafilactic. *Simptomele locale sau generale nu variază în raport cu natura substanţei anafilactizante folosite. Astfel, un cobai sensibilizat cu ser de cal va reacţiona, la o injecţie cu ser de cal, la fel cum reacţionează un alt cobai preparat cu albuş de ou la o reinoculare cu albuş de ou etc.*

Sindromul anafilactic este, în consecinţă, o boală nespecifică.

Simptomele sindromului anafilactic variază în raport cu calea de reinjecţie a antigenului, cu doza injectată, cu specia animală folosită şi, în cadrul aceleiaşi specii, cu predispoziţia reactivă a organismului. Acest din urmă factor are, după Zdrodovski, o importanţă deosebită şi existenţa lui explică modul diferit de comportare a indivizilor din aceeaşi specie faţă de aceleaşi condiţii experimentale. Se observă, în această privinţă, că 30% din iepurii preparaţi sînt refractari, adică nu fac şoc la reinjecţie, cu toate că produc anticorpi. Predispoziţia reactivă a organismului este în legătură cu factorii de mediu, cu starea sistemului endocrin, starea sistemului nervos etc.

La cobai, manifestările clinice şi anatomo-patologice ale şocului sînt cele mai tipice şi apar cu cea mai mare regularitate. Dozele provocante mici produc, la acest animal, doar o stare de nelinişte; animalul se agită, îşi scarpină cu labele anterioare botul şi urechile şi apoi revine în scurt timp la normal; în urma injecţiei unei doze convenabile şi pe cale intra-

Scanned with OKEN Scanner

venoasă, stării de neliniște inițiale îi urmează agitații puternice, convulsii, respirație dispneică ; animalul urinează și defecă ; se învîrtește în jurul său ; se agită, apoi, extenuat, cade pe o latură, respirația devine din ce în ce mai grea, animalul deschide gura, uverturile nazale se dilată, fără însă ca aceste eforturi să împiedice asfixia ; cobaiul moare asfixiat în cîteva minute. În timpul șocului, pe lîngă aceste manifestări exterioare s-au mai putut pune în evidență și alte modificări organice, ca : o importantă scădere a presiunii sanguine (ceea ce face ca recoltarea sîngelui, chiar din carotidă, să fie imposibilă), micșorarea titrului alexic al serului sanguin, hipotermie în cazurile grave, hipertermie în cele benigne.

La deschiderea cadavrului unui cobai mort în urma șocului anafilactic, ceea ce atrage atenția în primul rînd sînt dimensiunile pulmonului, care este palid, mult mărit în volum, acoperind în întregime cordul ; bronhiile sînt contractate și pline cu o spumozitate sanguinolentă ; mucoasa bronhială edematiată ; alveolele sînt mult destinse de aer și, datorită acestei distensiuni, pulmonul capătă dimensiuni atît de mari. Alături de leziunile pulmonare se mai constată congestia ficatului și a intestinului ; sîngele este necoagulat ; cordul se contractă neregulat încă mult timp după încetarea respirației și chiar după deschiderea cadavrului.

La cobai, alături de formele de șoc descrise mai sus, s-au descris reacții de tip anafilactic de o durată mai lungă, șoc prelungit. Reacția, în acest tip de șoc, este puțin manifestă din partea aparatului respirator, în schimb animalul prezintă o stare de somnolență căreia îi urmează coma și moartea sau vindecarea. Somnolența este însoțită de o scădere a presiunii sanguine și de o hipotermie însemnată, temperatura putînd scădea cu cîteva grade (7, 9 și chiar 13°C) sub normal. Animalele moarte pot prezenta sau nu distensiuni pulmonare. Pulmonul este însă puternic edematiat și hemoragic. Glanda suprarenală prezintă, la fel, leziuni celulare.

La iepure, injecția de probă, făcută pe cale intravenoasă, produce fie o reacție rapidă, mortală în cîteva minute fie un șoc cu o evoluție prelungită cîteva ore. Agitațiile și convulsiile sînt mai puțin manifeste ca la cobai și tabloul clinic este dominat de starea de depresiune, datorită slăbiciunii musculare. Dificultățile respiratorii sînt accentuate în ambele forme. Presiunea sanguină este mult scăzută atît în forma rapidă, cît și în cea prelungită. Leziunile pulmonare ale iepurelui, mort în urma șocului anafilactic, diferă de ale cobaiului : iepurele nu prezintă acea distensiune pulmonară caracteristică cobaiului. Tulburările respiratorii observate par a fi consecința unei vasoconstricții importante a arteriolelor pulmonare. Această vasoconstricție poate fi rezultatul unor tulburări funcționale a cordului sau unui spasm vascular. Organele splanhnice sînt congestionate. Mucoasa intestinală este hiperemiată, edematiată, prezentînd descuamații epiteliale și, în cazurile prelungite, necroze superficiale.

Șoarecii albi se pot sensibiliza cu ser de cal sau alt antigen ; moartea, în urma injecției de probă, survine 20—40 de minute după administrarea alergenului, pe cale intravenoasă.

Pisica este foarte sensibilă, în mod normal, față de proteinele serice. Astfel, 0,0025 ml de ser de cal, injectat intravenos, la o pisică normală, nesensibilizată artificial, produce un șoc anafilactic tipic și violent. În aceste condiții este greu să se obțină animale sensibilizate.

Scanned with OKEN Scanner

La cîine, şocul se manifestă prin dispnee, vărsături, diaree şi, în cele din urmă, printr-o profundă somnolenţă. Moartea nu survine înainte de 30 de minute. Leziunile, pe cadavru, sînt de tip congestiv şi cuprind, în special, ficatul şi peretele intestinal. Ficatul are, în producerea şocului, un rol esenţial şi s-a constatat, în acest sens, că animalele cu ablaţia ficatului nu fac şoc.

Păsările pot fi anafilactizate experimental şi, în special, porumbelul reacţionează prin şoc, dispnee, salivaţie, lacrimaţie etc. la injecţia de probă, practicată pe cale intravenoasă.

Calul a putut fi sensibilizat, în condiţii experimentale. Injecţia de probă poate provoca un şoc local — în cazul inoculării subcutanate — sau unul general — în cazul injecţiei intravenoase. Calul este, în general, sensibil la proteinele străine şi el poate reacţiona prin şoc chiar la o primă injecţie de proteină serică eterogenă.

La capră, reinjecţiile cu ser de cal pot provoca şoc cu evoluţie gravă, mortală.

*

In concluzie, simptomele şocului anafilactic sînt, la toate speciile animale, în general, aceleaşi şi ele sînt o consecinţă a tulburărilor care afectează circulaţia sanguină şi musculatura netedă. Tulburările circulatorii explică edemele şi peteşiile care apar, regulat, în cursul şocului anafilactic, local sau general, iar cele ale musculaturii netede sînt răspunzătoare de spasmul bronşic, intestinal, vezical etc.

CAUZELE ŞOCULUI ANAFILACTIC

Şocul anafilactic, ca şi toate fenomenele alergice, este o consecinţă a constituirii, in vivo, a complexului antigen-anticorp. Aceasta reiese din următoarele caracteristici ale fenomenului şi anume :

1. specificitatea sensibilizării ;
2. unitatea manifestărilor clinice şi independenţa acestora de toxicitatea proprie a produsului sensibilizant ;
3. instalarea sensibilităţii concomitent cu apariţia anticorpilor în organism ;
4. transmiterea pasivă a stării de sensibilitate prin serul unui animal sensibil ;
5. dispariţia proprietăţilor sensibilizante ale unui asemenea ser prin contactul cu antigenii respectivi, deci prin eliminarea anticorpilor ;
6. desensibilizarea unui animal prin contactul, in vivo, cu antigenii pentru care e sensibilizat.

Unde se constituie complexul antigen-anticorp ? Complexul antigen-anticorp se constituie, după unii cercetători, în celule, şocul rezultînd din cuplarea anticorpilor din celule sau anticorpilor sesili cu antigenul. După alţi autori complexul se constituie în umori.

Ipoteza celulară se sprijină pe următoarele fapte experimentale.

1. O porţiune de uter sau intestin, provenind de la un animal sensibilizat, nu se desensibilizează prin perfuzare cu soluţie Ringer şi eliminarea, în consecinţă, a sîngelui din vase, deci a anticorpilor umorali. Acest

argument nu este socotit valabil de susținătorii teoriei umorale. Spălarea, spun aceștia, nu poate antrena și umorile intercelulare și, în consecință, persistența sensibilității țesutului față de antigenul sensibilizant poate fi datorită prezenței anticorpilor din aceste umori.

2. Anafilaxia pasivă nu se instalează imediat după injecția serului provenind de la animalul sensibil; regulat, la câini și cobai, și mai puțin regulat la iepuri și șoareci, este necesar un interval de câteva ore între administrarea serului, chiar pe cale intravenoasă, și apariția sensibilității. Acest interval este necesar pătrunderii anticorpilor din ser în celule; în acest sens s-a constatat că obținerea șocului nu este posibilă, la cobai, dacă se injectează întîi antigenul și apoi anticorpul (anafilaxia inversă).

3. Speciile animale — iepurele etc. — care dau bune seruri precipitante, deci là care anticorpii se găsesc mai mult în circulația sanguină decît în celule, se sensibilizează mai greu ca speciile al căror ser este sărac în aticorpi și care reține majoritatea acestor principii în celule — cobaiul. Prezența anticorpilor în umori ar putea, imobilizînd antigenii, să inhibe chiar șocul.

4. Înlocuirea sîngelui animalului sensibilizat, într-o proporție care poate atinge 98%, cu sînge unui animal normal, nu duce la desensibilizarea organismului. Anticorpii anafilactizanți sînt deci fixați în celule și nu sînt antrenați afară din organism prin eliminarea sîngelui. Acest argument este socotit de unii cercetători ca nevalabil, deoarece eliminarea sîngelui nu antrenează și eliminarea umorilor intercelulare.

Teoria umorală se sprijină pe unele cercetări din care reiese că șocul anafilactic se datorește unui produs toxic ce ia naștere în organism ca o consecință a constituirii, in vivo, a complexului antigen-anticorp. Produsul toxic, dat fiind faptul că unii principii umorali, alexina sau compușii săi, iau parte la formarea lui, s-ar constitui chiar în umori.

Mecanismul șocului anafilactic. Complexul antigen-anticorp, indiferent de locul unde s-ar constitui, nu exercită o acțiune nocivă directă, nu provoacă șocul prin simpla sa prezență în organism. Într-adevăr, injecția intravenoasă a floculatului obținut, in vitro, prin amestecul unui ser provenind de la un animal în stare anafilactică cu antigenii respectivi, nu produce șoc. La fel, sînt inactive și injecțiile de pulberi anorganice fine. Șocul nu este deci rezultatul acțiunii mecanice a complexului constituit de anticorpi cu antigenii respectivi. El este determinat de alți factori. Numeroși cercetători admit că în producerea șocului intervine o substanță care se eliberează din țesuturi, ca urmare a acțiunii complexului antigen-anticorp. Manwaring (1928) a arătat, în acest sens, că o porțiune de intestin, provenind de la un animal insensibil, grefată la un animal sensibil, ia parte la șoc, prin musculatura sa netedă, în aceeași măsură ca și musculatura netedă a animalului sensibil. Această experiență dovedește că un produs circulant determină contracția tuturor fibrelor musculare netede care sînt integrate în sistemul circulator al unui animal sensibil. De altfel, același autor a dovedit că în anumite condiții se poate pune în evidență prezența principiului anafilactizant chiar în sîngele animalelor în curs de reacție. Astfel, un câine normal reacționează prin șoc anafilactic îndată ce i se face o transfuzie cu 100 ml de sînge recoltat din vena portă,

Scanned with OKEN Scanner

dar nu din carotide, de la un cîine care se găseşte în curs de reacţie anafilactică.

Complexul antigen-anticorp constituit in vivo nu este deci nociv, prin el însuşi, ci printr-o substanţă a cărei apariţie el o provoacă. Originea şi natura acestei substanţe nu au fost însă complet lămurite; unii autori o consideră de origine celulară şi o identifică cu unii produşi celulari normali ca histamina, acetilcolina, iar alţii afirmă că ea se naşte în umori prin cuplarea complexului antigen-anticorp cu un compus normal — alexina — al sîngelui circulant.

Substanţa răspunzătoare de şoc nu alterează funcţional şi anatomic celula, ceea ce constituie un argument în favoarea naturii ei fiziologice. Într-adevăr, o porţiune de intestin sau o porţiune de corn uterin, sensibilizate şi puse în contact cu antigenul respectiv, păstrează, după şoc, toate funcţiunile lor anterioare, iar un animal sensibilizat se remite repede după şoc dacă condiţiile de experimentare n-au fost prea severe. Efectele nocive pe care substanţa răspunzătoare de şoc le provoacă par a fi deci datorite nu naturii ei, ci cantităţii excesive în care se pune în libertate în organism sub influenţa excitantă a complexului antigen-anticorp. Acest fapt ar sprijini natura ei fiziologică. Un asemenea mod de comportare a unei substanţe fiziologice este întîlnit şi în alte procese şi B î k o v spune în această privinţă: „unul şi acelaşi mecanism, în raport cu condiţiile sale de apariţie, cu condiţiile de acţiune, poate avea, într-un caz, rolul unui factor de extremă importanţă pentru funcţionarea normală a organismului, iar, în alt caz, printr-o modificare a condiţiilor sale sau a intensităţii sale, se poate manifesta într-un mod patologic". Dintre numeroasele substanţe organice cercetate în această privinţă, histamina a fixat mai mult atenţia cercetătorilor. Această substanţă, descoperită de B e r g e r şi D a l e în 1911, derivă din histidină (aminoacid) prin decarboxilare şi a fost găsită în diversele organe ale animalelor normale. De exemplu, pe kilogram, pulmonul conţine 35—75 mg, ficatul 3,5—6,6 mg, pielea 6 mg, muşchii voluntari 1 mg, testicului 1,8 mg, glanda maxilară 0,5 mg. Histamina, administrată pe cale intravenoasă, la cobai, iepure, cîine, porumbel, în doze de 0,3, 3,3 şi 1,5 mg, produce un şoc asemănător celui anafilactic: spasm bronşic şi stenoză bronşică la cobai, blocarea sîngelui în capilarele hepatice la cîini etc. Musculatura netedă reacţionează de asemenea, in vitro, faţă de histamină. Injectată intradermic, la omul normal, ea produce o reacţie urticariană identică cu aceea produsă de un antigen la o persoană sensibilă. Unele deosebiri există totuşi între şocul histaminic şi cel anafilactic. Astfel, în şocul histaminic sîngele se coagulează în vase, hemoragiile capilare lipsesc, iar congestia ficatului la cîine este mai puţin severă ca în şocul anafilactic. De asemenea, şocul anafilactic este inhibat de atropină, cel histaminic însă nu. In acelaşi sens, A d o (1951) observă că acţiunea antigenilor asupra sinapselor colinergice ale cordului, intestinului şi altor organe nu duc, în mod obligatoriu, la o producţie de histamină, iar U d r i n ţ e v (1939) constată că acţiunea antigenilor serici asupra ansei izolate a intestinului nu este însoţită de producţie pe histamină, deşi contracţia anafilactică se produce. Rezultate asemănătoare obţin P e n i k o v s k a i a (1947), T o l p e g h i n a (1949) şi alţii. A d o şi colaboratorii constată, în plus, că substanţele antihistaminice ca benedrilul (clorhidrat-dime-

til-aminoetil al eterbenzidrolului), deşi inhibă şocul histaminic al intestinului izolat de cobai, nu are o acţiune similară asupra şocului anafilactic produs prin antigeni serici. Ado, în urma acestor experienţe, conchide că histamina, care apare în unele reacţii anafilactice locale, nu este expresia acţiunii directe a excitantului, ci este rezultatul acţiunii destructive a antigenilor asupra ţesuturilor. Ea este, după autor, un produs tisular final şi nu iniţial; ea rezultă din reacţia alergică şi nu este cauza ei. Apariţia ei în cursul şocului anafilactic nu este totdeauna obligatorie, pentru că nu totdeauna se ajunge la faza de distrugere tisulară, fază în care se eliberează histamină. Pentru aceste motive procesele histaminergice nu sînt obligatorii în şocul anafilactic.

Meilik, Megrahov (1937), Went, Lisman (1935—1939), Ado, Udrinţev şi Masino (1944), Danielopolu (1944) şi alţii consideră că substanţa răspunzătoare de şoc este acetilcolina. Danielopolu constată, în acest sens, că clorhidratul de acetilcolină administrat pe cale intravenoasă la cobai, în doză de 3 mg, produce un şoc de tip anafilactic. Identitatea celor două reacţii — şocul anafilactic şi şocul acetilcolinic — rezultă, după autor, şi din aceea că ambele sînt inhibate de atropină. Ado şi colaboratorii (1944) fac constatări similare, observînd că şocul anafilactic este însoţit de o producţie de acetilcolină, ca o consecinţă a acţiunii antigenului asupra sinapselor sistemului nervos vegetativ din diverse organe. Tolpeghina, lucrînd pe cordul izolat de cobai, pe care a provocat şocul anafilactic cu antigeni provenind din *Salmonella typhosa,* ajunge la concluzia că aceşti antigeni exercită o acţiune directă asupra sinapselor colinergice din ţesuturile cordului, provocînd formarea mediatorilor corespunzători.

Ado, ocupîndu-se de relaţiile dintre imunitate şi alergie, afirmă că cele două procese reprezintă manifestări ale reactivităţii imunologice a organismului. Problema nerezolvată încă este a motivelor care fac ca aceleaşi cauze să ducă uneori la şoc, alteori la rezistenţă. Ado găseşte explicaţia acestui mod diferit de reacţie în concepţia despre excitaţie şi inhibiţie, fondată de Vvedenski, Secenov şi Pavlov. Intr-adevăr, scrie el, în orice excitaţie imunizantă se pot observa faze de excitabilitate crescută faţă de acţiunea repetată a antigenilor, faze în care organismul va răspunde printr-o reacţie alergică, precum şi faze de inhibiţie a reactivităţii faţă de un antigen, faze de desensibilizare şi imunitate. Ado încadrează, astfel, imunitatea şi alergia în concepţia despre excitaţie şi inhibiţie.

In concluzie, se poate spune că elementul primordial al şocului anafilactic îl constituie antigenul. Acesta, in vivo, produce anticorpii, care rămîn şi se păstrează în organism. Cînd anticorpii se întîlnesc, in vivo, cu antigenul care i-a generat, se produce cuplarea celor două elemente şi constituirea complexului. Complexul, constituit in vivo, excită sistemul nervos care, la rîndul său, provoacă apariţia mediatorilor chimici. Aceştia, producîndu-se în cantităţi mari, provoacă şocul. După Berger (1940), reacţiile anafilactice şi reacţiile alergice, în general, s-ar petrece în trei faze şi anume:

1. faza reacţiei dintre antigen şi anticorp;
2. faza de excitaţie, de formare a excitanţilor;
3. faza răspunsului organic.

Scanned with OKEN Scanner

Sistemul nervos este implicat într-o mare măsură în apariţia stărilor alergice şi în reacţiile organice de tip alergic.

Intervenţia sistemului nervos rezultă, pe de o parte, din constatarea că şocul nu se produce la animale anesteziate (Zdrodovski), iar, pe de altă parte, că şocul nu apare la animale care au un sistem nervos rudimentar. Acestea din urmă pot produce anticorpi, dar nu fac şoc anafilactic. Omul, care are cel mai dezvoltat sistem nervos prezintă cel mai frecvent stări alergice.

EVITAREA ŞOCULUI ANAFILACTIC

Besredka (1907), plecînd de la constatarea că un animal care a supravieţuit unei injecţii de probă devine rezistent faţă de antigenul respectiv şi că, în doze reduse, antigenul provoacă, chiar pe cale intravenoasă, un şoc benign, însă desensibilizant, propune un procedeu de desensibilizare, de vaccinare faţă de şocul anafilactic, cunoscut sub numele de metoda injecţiilor subintrînde. Metoda constă în a injecta, iniţial, organismului sensibil, doze mici de antigen, de preferinţă pe cale subcutanată, dar, în caz de nevoie, chiar pe cale intravenoasă. Unui om sensibil faţă de serul de cal, care deci a mai fost injectat cu un asemenea ser, i se poate injecta, de exemplu, 0,25 ml de ser pe cale subcutanată sau 1 ml dintr-o soluţie 1/10 ser în apă fiziologică pe cale intravenoasă. Injecţia subcutanată este urmată la interval de 2—3 ore de a doua injecţie cu o doză mai mare, 1—3 ml, şi după alte 3 ore se poate injecta doza totală; desensibilizarea, pe cale intravenoasă, se face mai repede şi a doua injecţie cu doza terapeutică totală se poate aplica la 10—15 minute după prima.

Desensibilizarea prin acest procedeu se datoreşte neutralizării treptate a anticorpilor. Complexul antigen-anticorp, constituit în urma injecţiei unei cantităţi mici de antigen, nu poate produce şocul, dar desensibilizează organismul. Vaccinarea sau antianafilaxia, astfel obţinută, nu este durabilă; ea dispare o dată cu eliminarea antigenului din organism; nu este absolută, căci cantităţi mari de antigen o pot învinge. Ea este, într-o oarecare măsură, specifică, deoarece un organism sensibil faţă de mai mulţi antigeni nu se desensibilizează faţă de toţi antigenii prin neutralizarea unui singur anticorp. Specificitatea desensibilizării nu este însă strictă; se observă, astfel, că un organism sensibilizat faţă de mai mulţi antigeni şi desensibilizat faţă de unul din ei nu mai răspunde, cu aceeaşi intensitate, la un al doilea antigen; organismul capătă obişnuinţa faţă de complexul care provoacă şocul. Astfel de desensibilizări, numite nespecifice sau heteroloage, se observă şi în urma unui şoc anafilactoid, provocat de peptonă sau alte substanţe avînd asemenea însuşiri. Moldovanu şi colaboratorii săi afirmă că desensibilizarea nespecifică este datorită faptului că, în cursul şocului anafilactic, organismul fabrică un principiu cu acţiune inhibitoare faţă de şoc. Acest principiu antianafilactic ar fi produs de celulele endoteliale, sub influenţa complexului antigen-anticorp şi autorii îl numesc reticulină. Ei observă, în acest sens, că serul cobailor, injectaţi cu materii iritante pentru ţesutul reticuloendotelial (suspensii de bacilii tuberculozei morţi, cerneală de China, albastru de tripan etc.), are însuşiri antianafilactice: un asemenea ser inhibă şocul anafilactic dacă este administrat animalului sensibil înaintea injecţiei provocante.

Scanned with OKEN Scanner

Unele substanţe pot inhiba şocul sau evita efectele lui. Astfel, hipotensiunea caracteristică şocului poate fi combătută prin substanţe hipertensive. Clorura de sodiu are o asemenea acţiune şi 1 ml dintr-o soluţie saturată, injectat pe cale intravenoasă, conferă cobaiului o rezistenţă faţă de o doză de antigen sigur mortală pentru animalul sensibilizat şi neinjectat în prealabil cu clorură de sodiu. Adrenalina, prin acţiunea sa vasoconstrictoare, împiedică scăderea presiunii arteriale şi 0,2 ml dintr-o soluţie de 1/10 000 evită şocul la cobai. Spasmul bronşic al cobaiului poate fi evitat prin narcoză (B e s r e d k a). Atropina, acţionînd asupra parasimpaticului, paralizează muşchii netezi şi împiedică spasmul acestor muşchi în şocul anafilactic. Atropina este activă şi in vitro; adăugată soluţiei Ringer, ea împiedică contracţia cornului uterin sensibilizat sau peretelui intestinal sensibilizat. Şocul anafilactic este evitat şi prin inhibiţia sistemului nervos central, ca şi prin inhibiţia sistemului nervos simpatic (A d o).

BOALA SERULUI

Injecţia, la om, a serului sanguin al unei specii animale, poate da naştere la două categorii de tulburări şi anume: şocul anafilactic şi boala serului.

Şocul anafilactic apare, de regulă, la persoanele care au mai fost injectate cu serul aceleiaşi specii animale şi numai excepţional în urma primei injecţii de ser heterolog. Simptomele apar scurt timp după injectarea serului şi sînt cele ale şocului analifactic descris la animale, în special la cîine. Ele constau din scăderea presiunii arteriale şi, ca o consecinţă, paliditatea feţei şi a mucoaselor, puls slab şi frecvent, tulburări respiratorii — dispnee, cianoză, — tulburări gastrointestinale — vărsături, diaree — tulburări ale sistemului termoregulator — hipotermie. Gravitatea şocului variază de la un caz la altul. Mortalitatea este redusă sau chiar, după unii autori, neexistentă. Injecţiile intravenoase şi intrarahidiene dau mult mai frecvent tulburări anafilactice ca cele subcutanate; calea subcutanată nu ar produce şoc decît atunci cînd, accidental, prin dilacerarea unui vas din ţesutul subcutanat, serul este introdus în circulaţia generală. Reinjecţiile cu ser heterolog pot produce şi la animale şoc anafilactic. Manifestările sînt cele descrise la om şi animale de experienţă.

Boala serului este întîlnită numai la om; ea apare ca urmare a unei prime sau secunde injecţii de ser heterolog; reinjecţiile produc mai frecvent boala serului ca primele injecţii. Simptomele apar după o perioadă de incubaţie de cîteva zile, de regulă 6 zile, şi ele constau din febră, exantem la locul de administrare a serului sau exantem generalizat, dureri articulare şi musculare, albuminurie.

Boala serului deşi se deosebeşte prin manifestările sale clinice de şocul anafilactic, se produce printr-un mecanism similar. Antigenul injectat produce anticorpi care apar înainte ca întreaga cantitate de antigen să fi dispărut din organism. In consecinţă, anticorpii formaţi mai găsesc în organism antigen cu care se cuplează constituind complexul activ. Intre apariţia simptomelor şi formarea anticorpilor în sînge este, într-adevăr, o strînsă legătură. Astfel, anticorpii precipitanţi au putut fi puşi în evidenţă înainte, în timpul şi după apariţia simptomelor la persoanele injectate cu ser heterolog. Serul unor asemenea persoane poate sensibiliza pasiv cobaiul faţă de serul heterolog care a produs boala serului.

IDIOSINCRAZIA SAU EXOALERGIA

Idiosincraziile sînt stări de sensibilitate exagerată pe care unele organisme ale speciei umane le capătă prin contactul cu unele substanţe exogene; persoanele găsindu-se

sub imperiul acestor stări reacţionează altfel decît persoanele normale, în prezenţa substanţei pentru care sînt sensibili; tipul reacţiei este independent de natura şi proprietăţile substanţei sensibilizante. Instalarea stărilor idiosincrazice este condiţionată de predispoziţia individuală şi de contactul cu materia alergizantă. Predispoziţiile individuale se transmit ereditar. Unii exoalergeni au o răspîndire universală, dar numai persoanele cu asemenea predispoziţii devin idiosincrazice. Procentul persoanelor cu asemenea predispoziţii variază de la o ţară la alta: el este de 0,82% în Elveţia şi de 7% în Statele Unite ale Americii. Sensibilitatea faţă de exoalergeni nu se transmite ca atare, ci numai ca predispoziţie. Intr-adevăr, copiii, îndată după naştere, nu prezintă stări idiosincrazice, chiar dacă provin din părinţi sensibili; ei sînt însă susceptibili de a le căpăta prin contactul cu alergenii, ceea ce nu se întîmplă, de regulă, cu persoanele care nu au moştenit asemenea predispoziţii.

Idiosincraziile, netransmiţîndu-se ereditar, instalarea lor este condiţionată de contactul cu alergeni. In regulă generală, cu cît contactul dintre organism şi alergen este mai masiv şi mai prelungit, cu atît sensibilizarea este mai sigură. Căile de contact cu alergenul sînt variate: pielea, mucoasele, diversele ţesuturi.

Alergenii idiosincrazici sînt foarte variaţi ca origine şi structură chimică; polenul florilor, sporii unor ciuperci din genurile *Aspergillus, Penicillium, Mucor* şi *Puccinia,* praful răspîndit de fulgii păsărilor sau ridicat de pe pielea animalelor, praful cerealelor, praful camerelor, unele alimente ca laptele, ouăle, peştele, mierea de albine, fragile, roşiii, unele substanţe chimice ca acidul picric, sărurile de nichel, mercurul, cuprul, unele medicamente ca aspirina, chinina, veronalul, piramidonul, compuşii arsenicali, mentolul, timolul etc, pot sensibiliza omul.

Unele din aceste substanţe sînt antigeni, altele nu sînt.

Produsele medicamentoase cum sînt compuşii arsenicali, aspirina, compuşii iodului etc. nu sînt antigeni, însă ele pot deveni în organism, prin cuplarea lor cu o proteină a organismului respectiv. Proteina, în urma fixării acestei substanţe, devine străină pentru organism şi aceasta o tratează ca atare, distrugînd-o şi fabricînd pentru ea anticorpi. In sprijinul acestei ipoteze stau nu numai toate cunoştinţele noastre despre anticorpi, dar şi fapte experimentale certe. Astfel, Landsteiner şi Iacobs (1935) au sensibilizat cobai faţă de unii compuşi aromatici, injectînd la animale proteine cuplate cu aceste substanţe. S-a putut deci demonstra, experimental, că produsele neantigenice pot sensibiliza un animal cînd ele sînt injectate la animalul respectiv după cuplarea cu un complex antigenic.

Stările idiosincrazice, ca şi celelalte stări de sensibilitate sînt datorite formării, în organism, a anticorpilor corespunzători alergenilor sensibilizanţi, iar reacţia idiosincrazică este o consecinţă a constituirii, in vivo, a complexului antigen-anticorp. Idiosincraziile, deşi recunosc intervenţia unui anticorp, nu pot fi transmise pasiv, de la om la animal, iar transmiterea de la om la om nu reuşeşte decît numai în anumite condiţii şi nu în toate cazurile. Astfel, serul unei persoane, sensibile faţă de albuşul de ou, nu transmite altei persoane sensibilitatea faţă de acest aliment. Dacă, aşa cum au făcut Prausnitz şi Küstner, se injectează serul persoanei sensibile — 0,1 ml — în dermul persoanei sănătoase şi dacă 24—48 de ore mai tîrziu, în acelaşi loc, se injectează albuşul de ou se obţine o reacţie de tip alergic identică cu aceea care se dezvoltă în orice regiune a învelişului cutanat la o persoană sensibilă faţă de albuşul de ou. Pielea, prin contactul cu serul persoanei sensibile, a împrumutat însuşirile dermului persoanei sensibile. Anticorpii au imbibat celulele şi le-au făcut sensibile faţă de antigen.

Transmiterea pasivă a sensibilităţii idiosincrazice cutanate nu poate fi realizată decît la om, animalele reacţionînd foarte inconstant; chiar la om, transmiterea nu se poate face în toate cazurile şi în toate idiosincraziile; unii indivizi, deşi sensibili, nu

Scanned with OKEN Scanner

transmit prin serul lor sensibilitatea cutanată unei persoane normale, ceea ce se explică prin aceea că serul lor nu conține sau conține foarte puțin reagine (anticorpi sensibilizanți).

Proba Prausnitz-Küstner este specifică; serul unei persoane sensibile față de albușul de ou, de exemplu, nu va sensibiliza dermul injectat decît față de această albumină. Un asemenea ser pierde prin contactul cu antigenul respectiv — albușul de ou în cazul luat drept exemplu — capacitatea de a sensibiliza pielea. Această constatare dovedește încă o dată că și acest fel de reacții alergice sînt consecința cuplării in vivo, a anticorpului cu antigenul respectiv.

Reacția idiosincrazică, ca și cea anafilactică desensibilizează, vaccinează față de un nou contact cu alergenul. Plecîndu-se de la această constatare s-au recomandat metode de desensibilizare artificială, constînd din administrarea, în anumite condiții, a alergenului sensibilizant la persoanele sensibile.

ALERGIILE DE INFECȚIE SAU ENDOALERGIILE

În cursul unor infecții, organismele umane sau animale capătă o stare de hipersensibilitate, o stare alergică față de paraziții înșiși sau față de unii constituenți ai lor. Astfel, tuberculina, injectată pe cale intradermică la oameni sau animale tuberculoase, produce un edem care poate fi urmat de cianoza și necroza pielii (fenomen Arthus), în timp ce la oamenii sau animalele normale produce, în aceleași condiții, doar o reacție superficială și fugitivă. La fel, calul morvos reacționează printr-o inflamație la injecția intradermică sau subcutanată a maleinei, în timp ce la calul sănătos reacția, nu are, în nici un caz, aceeași intensitate. Omul, imun față de virusul vaccinal, reacționează față de injecția intradermică a virusului respectiv (viu sau mort) prin formarea unei indurații eritematoase; această manifestare nu se observă la omul sensibil (P r i q u e t, 1907). Trecerea prin infecția cărbunoasă lasă organismului respectiv o stare de sensibilitate față de antigenul cărbunos, conținut de lichidul edemelor produse de această bacterie, la animale (B ă l t e a n u și col., 1943). În consecință, contactul cu parazitul sau cu secrețiile sale a modificat modul de reacție a organismului, i-a conferit o stare alergică, comparabilă, din multe puncte de vedere, cu hipersensibilitățile deja descrise. Într-adevăr: 1) sensibilitatea față de microbi sau de produsele lor de secreție este, ca și starea anafilactică sau idiosincrazică, o stare dobîndită și o consecință a contactului cu materii antigenice; 2) organismele prezentînd această stare reacționează, în prezența alergenului (antigen sau haptenă), pentru care sînt sensibile; reacția este deci specifică; 3) aspectul reacției este independent de însușirile produsului provocant; 4) reacția este rezultatul constituirii complexului antigen-anticorp în organism.

Reacțiile alergice sînt specifice, însă această specificitate nu este absolută. Se întîlnesc, într-adevăr, în cazul alergiei ca și în cazul imunității, abateri de la legea specificității. Se întîmplă, de exemplu, ca un organism sensibilizat față de un alergen să reacționeze mai slab și față de un alt antigen, ceea ce constituie fenomenul *de paraalergie*. Z d r o d o v s k i arată, în acest sens, că iepurii sensibilizați față de vibrionul holerei au o sensibilitate crescută și față de colibacili. Un fenomen, oarecum opus paraalergiei, îl constituie *metaalergia*. Acest termen desemnează trezirea unei sensibilizări, vechi și stinse, prin injecția unui alergen de altă natură. Metaalergia este în alergie ceea ce este reacția anamnestică în imunologie: o reacție „din aducere aminte".

Scanned with OKEN Scanner

Separarea alergiilor infecţioase de celelalte stări similare se sprijină pe unele caractere particulare ale celor dintîi. Astfel, alergiile infecţioase se disting de stările anafilactice, dar nu de cele idiosincrazice, prin aceea că sensibilizarea se realizează, în general, pe căi naturale. Se deosebesc însă de idiosincrazie prin aceea că în alergiile infecţioase alergenul este situat în intimitatea ţesuturilor, el este oarecum endogen, în idiosincrazii el fiind exogen. Pentru acest motiv, alergiile de infecţie au mai fost numite şi endoalergii, iar idiosincroziile, exoalergii. Alergenul, în alergiile infecţioase, are o origine internă, se produce în organism, în focarele patologice create de germeni. Alergiile infecţioase se instalează după o perioadă de timp de la pătrunderea germenului infecţios; durata acestei perioade este în funcţie de cantitatea de germeni, de virulenţa lor etc. dar, în general, ea este mai lungă ca în anafilaxie. Sensibilitatea o dată instalată se menţine, de regulă, cel puţin atît cît durează infecţia, dar ea se poate prelungi şi după dispariţia germenului infectant din organism.

Alergiile infecţioase sînt datorite prezenţei anticorpilor, iar reacţia alergică constituirii complexului antigen-anticorp în organism şi acţiunii exercitate consecutiv de acest complex asupra ţesuturilor. Anticorpul pare însă a fi în acest caz, în totalitatea lui, fixat în celule, deoarece, de cele mai multe ori, serul animalelor cu asemenea stări alergice nu îl conţine şi sensibilitatea la tuberculină, maleină etc., de exemplu, nu a putut fi transmisă unui animal normal prin serul unui animal tuberculos sau morvos. Chiar proba Prausnitz-Küstner, care descoperă cantităţi relativ mici de anticorpi, este, în aceste cazuri, negativă. Unii cercetători au încercat să transmită în mod pasiv, de exemplu, sensibilitatea la tuberculină cu ajutorul filtratelor, provenind din ţesuturi tuberculoase triturate. Ei au obţinut, uneori, rezultate pozitive, ceea ce pare a demonstra că anticorpul este fixat pe celule. În acelaşi sens, s-a mai constatat că alergia tuberculoasă poate fi transmisă la cobai prin sînge total de la cobai tuberculos (Stravisky, 1948) şi prin exudatul peritoneal al animalelor tuberculoase. Absenţa anticorpului, în serul sanguin al organismelor sensibile, nu exclude prezenţa lui în organism şi intervenţia lui în producerea stării alergice. De altfel nici şocul anafilactic cutanat nu este legat totdeauna de prezenţa anticorpilor în sînge. În acest sens, s-a constatat că omul capătă o sensibilitate cutanată dacă i se injectează 0,1 ml ser heterolog, deşi serul său, în urma acestei injecţii, nu conţine anticorpi precipitanţi sau sensibilizanţi decelabili prin reacţiile cunoscute şi nu transmite pasiv sensibilitatea la cobai. Reacţiile alergice locale se pot deci produce în absenţa anticorpilor circulanţi, decelabili prin metodele actuale cunoscute.

Manifestările clinice ale unor boli infecţioase par a fi, după unii autori, de natură alergică, decurgînd deci din constituirea complexului anticorp-antigen în organism. Se citează, în acest sens, cazul exantemului cutanat din scarlatină care nu se deosebeşte, clinic, de manifestările similare a căror natură alergică este neîndoielnică. Constituirea metastazelor, fixarea germenilor în ţesuturi ar fi favorizate de procesele alergice. O serie de cercetători (Feighina şi Agheicenko, 1940, Roskovskaia, 1944—1945) au observat că, în general, infecţiile au o evoluţie mai gravă la animalele cu stări alergice, decît la animale neavînd asemenea stări.

Sensibilitatea specifică faţă de un alergen poate sta la originea unor stări patologice. În infecţiile stafilococice umane, de exemplu, persistenţa

Scanned with OKEN Scanner

infecției pare a fi datorită sensibilității țesuturilor față de stafilococ sau față de secrețiile sale. Se constată, în acest sens, că germenul nu produce nimic la omul desensibilizat, dar dă reacții puternice la cel sensibil. Ipoteza pare a corespunde realității și în sprijinul acestei realități mai stă și faptul că prin desensibilizarea organismului, cu ajutorul injecțiilor repetate de germeni, se poate obține vindecarea bolii.

Starea alergică poate fi suprimată. Astfel, animalele tuberculoase, în stare de caşexie, nu mai reacționează la tuberculină. Alergia s-a transformat la ele în lipsă de alergie sau în anergie. Zdrodovski constată că stările alergice dispar în timpul somnului medicamentos. Astfel, iepurii, sensibilizați cu ser de cal și tinuți în stare de somn, nu fac artrita alergică în urma inoculării alergenului respectiv (ser de cal) într-o articulație. Sistemul nervos conduce deci reacțiile alergice.

AUTOALERGIA

Autoalergia este o stare alergică provocată de alergeni care au luat naștere în însuși organismul alergizat, pe socoteala propriilor lor proteine: autoalergia este deci produsă de autoalergeni, iar, ceea ce numim simplu alergie, de heteroalergeni, de unde și numele de heteroalergie ce i se dă. Proteidele proprii nu pot deveni alergeni pentru organismul respectiv, nu se pot transforma din omogene în heterogene, din proprii în străine, decît în urma unei alterări a naturii lor chimice, unei denaturări a lor, căci numai astfel se creează incompatibilitatea biologică între organism și ele, incompatibilitate care duce la o reacție din partea organismului și la instalarea stării de sensibilitate modificată sau de hipersensibilitate.

Denaturarea proteidelor proprii unui organism nu este un fenomen normal, nu se produce în condiții fiziologice normale, ci numai în urma acțiunii unor factori morbigeni. Factorii morbigeni care pot realiza o asemenea denaturare sînt multipli. Ei pot fi neanimați sau animați. Cercetările experimentale au arătat, în această privință, că diverse proteide se transformă, in vitro, în antigeni chiar pentru organismul de la care provin, dacă ele sînt tratate cu anumite substanțe. Astfel, Obermayer și Pick (1906) transformă proteidele unui animal în antigeni pentru el însuși prin introducerea în ciclul aromatic al aminoacizilor proteici a unor grupe chimice ca: I, N, NO_2; Landsteiner și Jablons (1914) prin tratarea serului cu formalină; Klopstock și Selter (1927) prin tratarea serului cu atoxil; Karady (1939) prin încălzirea serului timp de 1 minut la 56°C sau prin răcire la — 5°C timp de 90 de secunde; Sigal (1949, 1951) prin tratarea serului cu acid sulfuric sau iradierii cu radiu etc. (Sigal, 1952). Globulele roșii, pot deveni antigeni și provoca apariția hemolizinelor prin simpla lor hemolizare. Ehrlich și Morgenroth obțin, de exemplu, pe capră, un ser izohemolizant, inoculînd globulele roșii hemolizate de capră.

In unele stări patologice, țesutul propriu devine antigenic și capabil să sensibilizeze organismul respectiv. Petrov și Bogomolova observă, în acest sens, că se realizează o sensibilizare a cîinilor față de sîngele lor hemolizat, prin crearea unui abces de fixație cu esență de terebentină. Cîinii, care au avut un asemenea abces, reacționează la o inoculare a propriului singe hemolizat prin scăderea tensiunii arteriale, spasme și defecări, deci prin simptomele șocului anafilactic.

Karady, în 1939, observă că, prin simpla menţinere a cobailor la frig (—5°C) sau căldură (56°C), se produce o sensibilizare a lor faţă de propriul lor ser sanguin, respectiv răcit la —5°C sau încălzit la 56°C. Mai mult încă, un cobai ţinut o dată la —5°C face şoc anafilactic dacă se repetă această răcire după 2—3 săptămîni. În acest din urmă caz, injecţia preparantă şi injecţia declanşantă sînt înlocuite prin simpla răcire, adică prin operaţia care creează antigenul. Suţ a constatat mai departe şi în acelaşi sens, că ţesuturile lezate pot elibera antigeni sensibilizanţi; astfel, el observă că la animalele cu arsuri, extractul de piele arsă produce modificări cutanate caracteristice, în timp ce la animalele normale nu produce nimic asemănător. Aceste experienţe ne introduc în domeniul patologiei şi ne arată ce rol pot avea autosensibilizările în evoluţia procesului morbid.

Microorganismele patogene pot modifica ţesuturile în care se multiplică în aşa fel încît ele devin autoantigeni capabili să sensibilizeze organismul şi să creeze astfel, pe lîngă stările heteroalergice datorite microbilor, şi stări autoalergice, datorite ţesuturilor proprii modificate. Zinkova şi colaboratorii (1934), referindu-se la infecţia tuberculoasă, afirmă, în acest sens, că intoxicaţia tuberculoasă este legată de acţiunea simultană asupra organismului a bacililor tuberculozei şi a substanţelor din celulele tisulare ale focarului de tuberculoză. În experienţele acestor autori, ţesuturile tuberculoase dădeau, într-adevăr, reacţii serologice pozitive cu serul bolnavului. În patologia ochiului la om, Golovin, încă în 1904, a afirmat că în oftalmia simpatică, stările autoalergice au rol important. Leziunea unui ochi, mai ales la nivelul ciliar, duce la formarea unor autoantigeni care generează anticorpi faţă de produşii similari din ochiul congener. În patogenia nefritei scarlatinoase, procesele autoalergice au, de asemenea, un rol însemnat. Schwentker şi colaboratorii (1939) au arătat, în această privinţă, că ţesutul renal, tratat cu toxină streptococică sau stafilococică, devine antigenic pentru organismele speciei omoloage. Mai mult încă, serurile de la bolnavii de scarlatină dau reacţii pozitive în proporţii de peste 90% cu antigenul renal. Ţesutul renal pare că devine un autoantigen în cursul infecţiei streptococice şi anticorpii care iau naştere sînt răspunzători de unele leziuni ale rinichiului. In acest sens, Gavelti (1945) constată că serul unui animal pregătit cu antigen renal plus streptococ hemolitic, deci un ser care conţine anticorpi antirenali, inoculat la un animal, produce imediat albuminurie. Acţiunea patogenă a anticorpilor antirenali, numiţi încă şi nefrolizine, a fost pusă în evidenţă şi în alte condiţii. Lindeman (1901) şi Lindeman şi Nefediev (1901) obţin nefrolizine de la animale cărora li s-a provocat o glomerulonefrită prin acid cromic sau cărora li s-au ligaturat vasele unui rinichi.

Intervenţia proceselor autoalergice este manifestă şi în alte stări morbide. Iagnov şi colaboratorii (1950) afirmă că pozitivarea testelor de disproteinemie în bolile de ficat la om este rezultatul transformărilor pe care le suferă ţesutul hepatic, transformări care îl fac să producă anticorpi faţă de organismul propriu. Modificările care apar în tabloul globulinic al serului sanguin sînt deci datorite prezenţei unor anticorpi care au rezultat în urma acţiunii unui autoantigen şi anume a ţesutului hepatic lezat. Vlad şi colaboratorii (1952) arată că prin cauterizarea unor organe interne ale cîinilor (ficat, splină) se produc, la fel, modificări ale

Scanned with OKEN Scanner

spectrului proteinelor plasmatice, care sînt puse în evidenţă prin teste de disproteinemie (viteza de sedimentare a hematiilor, proba cu sulfat de cadmiu, proba timolului, proba Takata-Bauman, reacţia lui Weltmann) şi care sînt consecinţa acţiunii unor autoalergeni.

Procesele autoalergice, aşa cum reiese din aceste date, au un rol important în patologie.

PARAALERGIA

(PARAANAFILAXIA, FENOMENUL SANARELLI-SCHWARTZMANN SAU FENOMENUL ZDRODOVSKI-SANARELLI)

Paraalergia este starea de hipersensibilitate pe care un organism hipersensibilizat cu un alergen o prezintă faţă de un alt alergen. Paraalergia este o alergie heteroloagă şi constituie o abatere de la legea specificităţii reacţiilor dintre antigen şi anticorp.

Stări paraalergice s-au descris în cazurile celor mai diverse stări de hipersensibilitate şi, în general, se admite că un organism, alergizat faţă de un alergen, prezintă stări de sensibilitate deosebită şi faţă de alţi alergeni. Nu vom insista asupra acestor diverse stări paraalergice, dar ne vom ocupa de una din ele, de aşa-numitul fenomen Sanarelli-Schwartzmann sau Zdrodovski-Sanarelli, care prezintă o importanţă particulară prin aceea că explică unele leziuni întîlnite în diversele infecţii.

Datele experimentale. Primele observaţii asupra acestui fenomen au fost făcute de S a n a r e l l i (1919—1924) în cursul studiilor sale asupra vibrionului holerei. Cu ocazia acestor cercetări, autorul observă că iepurii, cărora li se administrează, pe cale intravenoasă sau intraperitoneală, o doză submortală de vibrioni ai holerei, mor dacă li se inoculează, cîteva ore mai tîrziu, pe cale intravenoasă, filtratul unei culturi de colibacili sau de proteus în doze inofensive pentru animalele normale. Moartea survine prin asfixie, în urma unei crize convulsive, cîteva ore după injecţia filtratului şi este precedată de hipotermie pronunţată, anurie, leucopenie, scăderea tensiunii arteriale. La autopsie, se constată o gastroenterită descuamativă, descuamarea seroaselor, retracţia vezicii urinare golite, congestia intensă a vaselor din cavitatea peritoneală, lichid hemoragic în cavitatea peritoneală, echimoze pe epiploon, nefrită acută şi, uneori hemoragii şi infarcte pulmonare. În intestinul subţire se găsesc aproape exclusiv numai vibrioni ai holerei. Procesul patologic este numit de S a n a r e l l i epitalaxie, adică descuamarea epiteliilor, iar Z d r o d o v s k i şi B r e n n (1924) îl numesc fenomenul Sanarelli, apoi reacţie anafilactoidă, iar mai tîrziu (1950) fenomenul Zdrodovski-Sanarelli. S a n a r e l l i afirmă că simptomele şi leziunile întîlnite la iepure reproduc algiditatea caracteristică holerei umane şi de aceea el a numit fenomenul şi algiditate experimentală. Z d r o d o v s k i (1923—1928), într-o serie de cercetări privind patogenia holerei, a arătat că algiditatea experimentală, la iepure, poate fi reprodusă cu cele mai diverse albumine (ovalbumina, de exemplu) şi pe cele mai diverse căi. Chiar administrarea pe cale digestivă poate produce sensibilizarea, dacă doza administrată este mare.

Un fenomen care a fost apropiat, de unii autori, de cel descris de S a n a r e l l i şi Z d r o d o v s k i este descoperit de S c h w a r t z m a n n, în 1928. Autorul observă că leziunea banală şi fugitivă pe care o provoacă injecţia intradermică a unui filtrat bacterian, se complică prin-

Scanned with OKEN Scanner

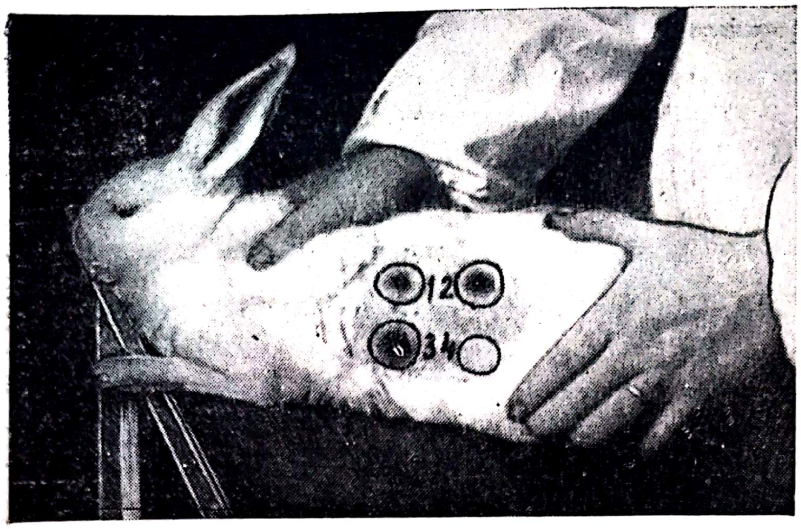


Fig. 55 — Fenomenul Schwartzmann la iepure (după **Popa O.**)

tr-un proces necrotic şi hemoragic, dacă 12—24 ore după injecţia intradermică se inoculează animalului, pe cale intravenoasă, acelaşi filtrat sau un filtrat provenind din cultura altei specii bacteriene. Reacţia hemoragică locală se constituie cîteva ore după administrarea intravenoasă a filtratului. Fenomenul este lipsit de specificitate; injecţia preparantă poate fi făcută cu filtratul unei specii bacteriene, iar cea provocantă, cu filtratul altei specii. Principiile preparante diferă de cele provocante; primele sînt de natură proteică, ca filtrate bacteriene, ser sanguin (peptonele sînt inactive), cele provocante pot avea şi altă natură. Astfel, pe lîngă filtratele bacteriene, în special cele ale colibacilului, pot avea efect provocant şi emulsiile de geloză 0,2%. Principiile active din filtratele bacteriene rezistă la 100° C, sînt precipitate de alcool şi de soluţii saturate de sulfat de amoniu.

Injecţia preparantă poate fi făcută şi pe altă cale decît intradermică; injecţia intravenoasă, ca şi injecţia într-un organ, sînt egal de active; în primul caz se produc, după reinjecţie, hemoragii diseminate în tot organismul, iar în al doilea caz, ele cuprind numai organul injectat. Adelsberg, de exemplu, a injectat substanţa preparantă în creier, obţinînd la reinjecţie leziuni în acest organ. Injecţiile preparante făcute în artera renală sînt urmate, după injecţia provocantă, de hemoragii care cuprind acest organ.

Un fenomen analog cu cele descoperite de Sanarelli şi Schwartzmann a fost descris de P. Bordet. Autorul observă că un cobai, cu leziuni tuberculoase provocate printr-o injecţie intraperitoneală de bacili moare, în cîteva ore, cu o hipotermie pronunţată, dacă i se administrează pe cale intravenoasă sau intraperitoneală fie o suspensie de colibacili sau proteus, fie filtratele culturilor acestor două specii, în doze inofensive pentru animalele normale. La autopsia cobailor se constată leziuni ale ganglionilor epiplooici şi anume ale acelor ganglioni care prezintă şi leziuni tuberculoase.

Explicaţia fenomenului. Sanarelli admitea că fenomenele hemoragice, care se produc în urma injecţiei intravenoase a filtratului colibacilar, la animalele infectate cu doze submortale de vibrioni ai holerei, sînt datorite reactivării focarelor latente de colibacili sub influenţa vibrionilor holerici. Reacţia, după Sanarelli, este omologă, deoarece el socoteşte că ţesuturile care reacţionează la filtratele colibacilare sînt sensibilizate tot de colibacili şi nu de vibrionii holerei, aceştia din urmă avînd numai o acţiune de reactivare.

Zdrodovski (1950), în urma cercetărilor făcute de el şi colaboratorii săi, consideră ca nefondată ipoteza reactivării vechilor focare colibacilare prin filtratele de colibacili. Experimentînd cu *Proteus vulgaris* şi cu filtratele sale, el reproduce fenomenul, deşi iepurii nu prezintă niciodată focare latente produse de această bacterie. Autorul admite, în urma acestor rezultate, cum şi în urma constatării făcute de Kolesnikov, că leziunea principală este localizată pe endoteliul vascular şi nu pe epiteliul mucoaselor şi seroaselor, cum credea Sanarelli, că fenomenul este de natură anafilactică şi este numit anafilactoid sau paraanafilactic pentru că se deosebeşte de şocul anafilactic prin viteza de instalare a sensibilităţii. Leziunile hemoragice sînt datorite degenerării pereţilor vasculari, degenerare care este o consecinţă a acţiunii unui toxic asupra unor celule sensibilizate prin acţiunea prealabilă a unui alt produs toxic.

Reacţiile paraalergice de tipul celor amintite mai sus stau sub dependenţa sistemului nervos. Nasta şi Negulescu (1951), Mazur şi Berlin (1953) au arătat, în această privinţă, că sindromul hemoragic cutanat descris de Schwartzmann nu se dezvolta la animalele anesteziate, local sau general, după ce au primit injecţia provocantă pe cale intravenoasă. Anestezia nu poate însă suprima moartea iepurilor sensibilizaţi pe cale intravenoasă sau a cobailor injectaţi cu B.C.G. (fenomenul Bordet P.).

Sager, Badenschi şi colaboratorii observă că, la animalele decorticate, reacţia hemoragică cutanată este mai intensă în regiunile corespunzătoare zonei de creier care a fost, în prealabil, decorticată, decît în regiunile normal inervate. Aceste experienţe pun în evidenţă rolul moderator al scoarţei în instalarea leziunilor cutanate. Reacţiile puternice, produse în zonele cutanate corespunzătoare zonei cerebrale decorticate, se explică prin acţiunea centrilor subcorticali, care, în absenţa activităţii moderatoare a scoarţei, dezvoltă o reacţie exagerată, de tip spinal. Absenţa reacţiei la animalele anesteziate se explică prin eliminarea tuturor centrilor nervoşi, corticali şi subcorticali.

Scanned with OKEN Scanner

MECANISMUL IMUNITĂȚII DOBÎNDITE

Imunitatea — starea de rezistență a unui organism — a fost atribuită întîi anumitor celule care constituie organismul, apoi umorilor acestuia. Îmbogățirea imunologiei în date experimentale și adaptarea, în această știință, a principiilor pavloviste, au dovedit că starea de rezistență reprezintă rezultatul unui răspuns reușit de adaptare la noi condiții biologice, răspuns făcut de întregul organism, de totalitatea celulelor și umorilor care îl constituie. Teoria imunității locale formulată de Besredka, pornind de la date experimentale incomplete, nu corespunde realității și ea nu mai are astăzi decît un interes istoric. Ea a fost înlăturată pentru că era în contradicție atît cu faptele, cît și cu legea unității organismului fundamentată de Pavlov. Pavlov scrie, în această privință: „aparatele de apărare acționează într-un sistem integral al organismului și care prin funcțiunile lor sînt reciproc legate între ele". Într-o asemenea concepție, teoria imunității locale nu-și găsește loc.

Starea refractară pe care o prezintă un organism uman sau animal se datorește activității coordonate a numeroși factori cum sînt modul de funcționare a sistemului nervos, capacitatea de reacție a celulelor, activitatea bactericidă și bacteriostatică a umorilor etc.

Sistemul nervos conduce și coordonează întreaga activitate a organismului și deci el dirijează și reacțiile umorale și celulare care asigură starea de imunitate. Activitatea fagocitară, producția de anticorpi stau sub dependența sistemului nervos. Fagocitele și anticorpii trebuie considerați ca elementele principale ale realizării stării de imunitate, ei acționînd în cadrul și cu concursul întregului organism și sub conducerea sistemului nervos.

În varietatea de mijloace care asigură apărarea organică, starea de imunitate, se pot recunoaște două sisteme cu rol principal și anume:

1. sistemul umoralo-celular;
2. sistemul alergic.

Aceste două sisteme nu pot fi totdeauna cu ușurință separate unul de altul, ele se pot asocia colaborînd la asigurarea rezistenței. Uneori însă, sistemul umoralo-celular funcționează fără nici un element alergic vizibil, alteori însă este precedat și favorizat, în acțiunea sa, de o stare alergică.

Scanned with OKEN Scanner

Reacția alergică, trebuie să adăugăm de la început, nu este activă prin ea însăși, ci ea acționează tot prin sistemul umoralo-celular, însă ea înlesnește mobilizarea elementelor sistemului umoralo-celular în punctul cel mai util pentru apărarea organismului. Această mobilizare se face prin intermediul sistemului nervos. În consecință, separarea celor două sisteme corespunde mai mult unor necesități didactice decît unor realități stricte. Realitatea defensivă este organismul viu cu toată complexitatea elementelor care îl compun. Pentru a înțelege această complexitate o disecăm și creăm sisteme. Creînd aceste sisteme nu uităm însă unitatea.

Sistemul umoralo-celular realizează distrugerea factorilor morbizi în organismele avînd o stare de imunitate față de factorii considerați. Sistemul celular poate acționa singur sau în colaborare cu sistemul umoral. La animalele inferioare (nevertebrate), celulele sînt singurele elemente ale apărării. De altfel, sistemul celular, privit din punct de vedere filogenetic, este cel mai vechi și el este prezent la toate metazoarele. Elementele antimicrobiene din umori apar mai tîrziu, o dată cu dezvoltarea sistemului nervos, și le găsim sub o formă cu atît mai dezvoltată cu cît animalele sînt situate pe o treaptă zoologică mai superioară. Sistemul defensiv umoral a atins cea mai mare perfecțiune la mamifere unde găsim stări de imunitate care rezultă din colaborarea dintre elementele celulare și umorale. Fenomenul Isaev-Pfeiffer constituie, în această privință, cel mai bun exemplu.

Reacțiile care se petrec in vitro și in vivo, între antigen și anticorp, înlesnesc, în general, neutralizarea și eliminarea antigenului. Însăși reacția de aglutinare care a fost socotită ca o manifestare secundară a procesului de imunitate pare că intervine în procesul de apărare. Intervenția ei nu este în toate cazurile manifest eficace, în sensul că nu duce totdeauna la o neutralizare și eliminare totală a antigenului, dar asta nu înseamnă că ea nu există. Unele observații par a arăta că și aglutinările își au rolul lor în apărarea organismului. Cercetările făcute in vitro arată că germenii aglutinați aderă la pereții tubului de sticlă mai mult decît cei care nu au suferit acțiunea anticorpului. Această aderență explică de ce grămezile de germeni aglutinați nu cad în tub ca germenii normali, adică la punctul maximei declivități, ci se răspîndesc în depozit umbeliform. Este de presupus că și in vivo germenii aderă, în prezența aglutininelor, mai bine la pereții vaselor în care se găsesc umorile, ceea ce înlesnește captarea lor de către fagocite.

Sistemul alergic, adică intervenția unui mecanism alergic în procesul de apărare antimicrobian și antitoxic, a fost descoperit de R. Koch. El a arătat că în infecția tuberculoasă reinjectarea bacililor duce la o reacție locală precoce și capabilă să realizeze neutralizarea și eliminarea antigenului. Alte observații au arătat că asemenea reacții precoce se întîlnesc și în alte infecții microbiene. Mecanismul distrugerii bacililor cărbunelui într-un organism imunizat este, de exemplu, tot de tip alergic. Se constată aici, ca și în cazul reinfecției tuberculoase, că injectarea bacililor cărbunelui la un animal imunizat duce la constituirea rapidă a unui focar inflamator în care se găsesc numeroase lichide și celule și în care bacilii cărbunelui sînt distruși. Rezistența este datorită capacității organismului de a concentra, la locul potrivit și în timp util, mijloacele de apărare ale organismului. Aceste mijloace nu sînt special create prin vaccinare, ci ele sînt mijloacele normale ale organismului. A. Boquet și N. Stamatin (1939) au arătat, în acest sens, că un focar inflamator creat prin inocula-

Scanned with OKEN Scanner

rea unor substanţe iritante are aceleaşi însuşiri neutralizante şi destructive ca şi edemul creat, la animale imune, printr-un mecanism alergic. Se pare, deci, că aceea ce în special se creează prin vaccinarea anticărbunoasă este starea alergică faţă de antigenul cărbunos.

Reiese din aceste date că sistemul alergic este un factor important în imunitate.

Unele stări de rezistenţă pot fi, însă, datorite şi altor factori decît fagocitelor sau anticorpilor. Există, într-adevăr, mecanisme fiziologice care în afara acţiunii fagocitozei sau anticorpilor intervin în cursul procesului infecţios şi, rupînd una din verigile sale, îi întrerup evoluţia. Astfel, aşanumita „imunitate de eliminare" de care s-a ocupat şi Mecinikov trebuie considerată ca avînd la bază un asemenea mecanism. Există, într-adevăr, cazuri în care nereceptivitatea la infecţie este datorită eliminării agentului morbid. Această eliminare este provocată, pe cale neuroreflexă, de către antigenii care devin în aceste cazuri excitanţi specifici ai propriei lor eliminări. Ado observă, în această privinţă, că toxina dizenterică administrată la iepurii imunizaţi se elimină prin rinichi. Antigenul dizenteric se elimină la animalele imune după tipul unei adevărate secreţii a acestor substanţe de către epiteliul tubilor renali. În condiţii experimentale, unele variante de bacili ai cărbunelui se elimină pe cale digestivă producînd, la unii cobai, leziuni pe tubul digestiv. Leziunile sînt datorite acelor bacili care, în cursul procesului de eliminare, s-au fixat în mucoase şi s-au multiplicat.

Alături de imunitatea de eliminare mai există şi alte mecanisme fiziologice care asigură nereceptivitatea, fără intervenţia fagocitozei sau a anticorpilor. Ado (1952) constată că la animalele imunizate antidizenteric creşte foarte mult excitabilitatea hemoreceptorilor din sinusul carotidian, astfel că o nouă inoculare, din acelaşi antigen, provoacă o creştere a tensiunii sîngelui din vase şi o stare hipertensivă care se opune stărilor de atonie vasculară şi de colaps care se instalează în cazul inoculării aceloraşi antigeni la animale normale, stări care produc moartea. În acest caz, un mecanism patofiziologic a creat starea de nereceptivitate. Acest fel de mecanisme de apărare faţă de o cauză de boală au fost numite de Pavlov „măsura fiziologică a organismului faţă de boală". Proporţia în care, de exemplu, un organism imunizat faţă de antigenii dizenterici poate ca, ridicîndu-şi tensiunea arterială, să evite colapsul toxiinfecţios, în caz de reinfecţie, reprezintă măsura sa fiziologică. Un organism ridică această tensiune mai mult, altul mai puţin, de aici diferenţele de comportare a diverselor organisme la reinfecţie. Lipsa de imunitate ce se constată la unii indivizi, în urma vaccinării, poate fi datorită şi acestor stări.

Scanned with OKEN Scanner

PARAIMUNITATEA

Paraimunitatea este starea de rezistenţă pe care un organism, rezistent faţă de un germen, o prezintă şi faţă de un alt germen. Animalele tuberculoase, de exemplu, au un grad oarecare de imunitate şi faţă de bacilii cărbunelui (Boquet şi Stamatin, 1939). Păsările tuberculoase, de asemenea, rezistă la o infecţie cu *Pasteurella* făcută cu doze care omoară regulat păsările normale (Stamatin şi col. 1953).

DATE EXPERIMENTALE ŞI DE OBSERVAŢIE

Gildemeistel şi Herzberg (1925) constată că serul animalelor imunizate faţă de virusul herpesului are proprietăţi neutralizante pentru virusul vaccinal şi, invers, aşa cum a dovedit Zurukzoglu, serul animalelor imune faţă de virusul variolei inactivează virusul herpesului. În acelaşi sens, Vişeleski şi colaboratorii dovedesc că serul cailor hiperimuni faţă de virusul encefalomielitei ruse neutralizează, pe lîngă virusul homolog, şi virusul rabic. În acelaşi sens, Nakil, arată că la caii vaccinaţi contra turbării se observă o rezistenţă apreciabilă faţă de virusul encefalomielitei cailor. Mai departe, Şt. Nicolau şi A. Galloway (1930) constată că serul animalelor, imunizate cu virusul maladiei de Borna fixează complementul nu numai în prezenţa virusului respectiv, dar şi în contact cu virusul rabic, herpetic, vaccinal etc. De altfel, aşa cum a arătat Stroian (1929) serul antiherpetic fixează la rîndul său, alexina în prezenţa virusului de Borna. Cercetările, privind natura acestor anticorpi, au pus în evidenţă prezenţa principiilor neutralizanţi, pentru unele virusuri, în serul animalelor normale şi care, foarte probabil, nu au venit niciodată în contact cu virusurile respective. Cobaii, de exemplu, pot conţine în serul lor anticorpi activi faţă de virusul herpesului, deşi acest virus nu afectează niciodată, în mod spontan, cobaii, şi animalele în general. La fel, anticorpi neutralizînd virusul amaril au fost găsiţi la oameni care nu au suferit niciodată şi nici nu au venit în contact cu bolnavi de febră galbenă. Serul unor animale, oi, boi, poate inactiva virusul febrei galbene, deşi provin din regiuni în care această maladie este inexistentă. Este foarte probabil că aceşti anticorpi sînt nespecifici şi au luat naştere prin contactul organismului respectiv cu alt virus decît cel cercetat. În cazul

infecţiilor bacteriene se constată, de asemenea, stări de paraimunitate, care uneori se traduc printr-o rezistenţă considerabilă, incomparabil mai mare ca rezistenţa conferită prin produse specifice. Astfel, găinile tuberculoase suportă 100 000 d.l.m. de cultură de pasteurelă aviară, în timp ce găinile tratate cu vaccinuri antiholerice nu rezistă în cazul cel mai bun decît la cîteva doze minime mortale de cultură (Stamatin şi col. 1953).

MECANISMUL PARAIMUNITĂŢII

Contactul cu un virus sau bacterie aşa cum reiese din datele de mai sus, poate conferi unui organism o stare de rezistenţă faţă de un alt virus sau bacterie. Un iepure, de exemplu, care a prezentat o leziune vaccinală pe cornee, suportă, fără a prezenta o inflamaţie a sistemului nervos, caracteristică acestui virus, o infecţie cu virusul herpesului (Nicolau). Nicolau şi Galloway observă, în acelaşi sens, că o maimuţă care a supravieţuit unei infecţii cu virusul maladiei de Borna devine insensibilă faţă de virusul poliomielitei. Distrugerea virusului în acest caz, ca şi în altele similare nu este datorită unor factori specifici, ci unei vigilenţe sporite, unei creşteri a potenţialului de apărare nespecific, provocată de acţiunea primului virus. În general, aşa cum am mai arătat, procesele inflamatorii conferă regiunii tisulare în care ele evoluează o rezistenţă remarcabilă faţă de unele infecţii. Un edem inflamator provocat în dermul unui iepure printr-o injecţie de toxină stafilococică, de exemplu, dă ţesutului respectiv o astfel de rezistenţă, încît inoculările masive cu bacili ai cărbunelui virulenţi sînt inofensive (A. Boquet şi N. Stamatin, 1939). Levaditi şi Nicolau (1925) au constatat în acelaşi sens, că amestecul de virus rabic şi virus vaccinal, injectat sub piele, la iepure, este lipsit de nocivitate. Virusul rabic este distrus de elementele tisulare care invadează regiunea injectată datorită funcţiunilor de apel exercitate de virusul vaccinal. Această destrucţie nu se face prin elemente organice specializate prin anticorpi, ci prin factori normali de apărare ai organismului, factori care răspund în acelaşi fel faţă de orice invazie, factori care sînt de natură celulară sau umorală. Activitatea lor este nespecifică şi, în general, de eficacitate redusă. Într-adevăr, în cele mai multe cazuri, imunitatea nespecifică nu poate fi comparată, ca intensitate, cu imunitatea specifică. De altminteri, trebuie să adăugăm că în cazul virusurilor rezistenţa nespecifică conferită printr-un virus nu este valabilă pentru toate virusurile. Ea se exercită faţă de unele, dar nu faţă de altele. Astfel, virusul vaccinal conferă o stare de rezistenţă nespecifică faţă de virusul herpesului, dar, aşa cum a arătat Borcilă şi Sîntu (1940), este total inactiv din acest punct de vedere faţă de virusul variolei ovine. Virusul variolei ovine, la rîndul său, imunizează animalele faţă de el însuşi, dar nu şi faţă de virusul variolei porcine. Încercările făcute, în practică, cu scopul de a vaccina porcii contra virusului variolei porcine, cu ajutorul virusului variolei ovine sau virusului vaccinal, nu au dat rezultate, ceea ce demonstrează, încă o dată, incapacitatea unor virusuri de a conferi animalelor o rezistenţă nespecifică faţă de toate celelalte virusuri.

Fenomenul de paraimunitate nu este, în consecinţă, general, în sensul că nu orice virus este capabil să provoace într-un organism, pe lîngă o

stare de imunitate față de el însuși și o rezistență față de alte virusuri. În cazurile cînd se constată procese de paraimunitate, acestea sînt uneori datorite înrudirii antigenice a virusurilor respective (astfel, se pare că virusul vaccinal este înrudit cu cel al herpesului, iar cel al encefalomielitei cu virusul rabic), alteori capacității pe care o are un virus de a mări potențialul defensiv general sau local al organismului. Procesul, în acest din urmă caz, este lipsit de specificitate.

Scanned with OKEN Scanner

IMUNITATEA LA PLANTE

Stări de rezistență naturală sau dobîndită se întîlnesc la toate vieţuitoarele, ceea ce apare de altfel ca foarte natural căci, în afara existenţei unor sisteme defensive antimicrobiene şi antitoxice, viaţa nu ar fi posibilă. Existenţa unor vieţuitoare nedotate cu mijloace de apărare antimicrobiană nu poate fi concepută.

Stări de imunitate au fost puse în evidenţă la organismele cele mai simple. Bacteriile, de exemplu, prezintă stări de imunitate naturală sau dobîndită faţă de anumite specii de bacteriofag. Astfel, *Escherichia coli,* de exemplu, este rezistentă faţă de bacteriofagii activi pentru stafilococi sau streptococi ; *Esch. coli* prezintă deci o stare de imunitate naturală faţă de anumite specii de bacteriofag. Dar, mai mult încă, *Esch. coli* poate căpăta o stare de imunitate faţă de un bacteriofag activ pentru ea. Punînd în contact o cultură tînără (în fază de dezvoltare logaritmică sau exponenţială) de *Esch. coli* cu un bacteriofag coli, acesta din urmă va produce îmbolnăvirea şi moartea unui număr important de colibacili ; dar, se constată cu regularitate că mortalitatea nu este de 100% şi, în consecinţă, unii germeni rezistă asaltului dat de parazit. Mai mult încă, aceşti germeni care au rezistat se dezvoltă de acum înainte în prezenţa parazitului, ei devenind imuni faţă de el. Celulele bacteriene rămase sînt deci imune şi imunitatea lor este legată de persistenţa parazitului în intimitatea celulei ; este deci o stare de premunitate. Această stare de premunitate nu este prezentă numai la celulele care au fost puse în contact cu parazitul, ci ea se transmite din generaţie în generaţie şi M. Ciucă (1953) a constatat această transmitere la o cultură de *Esch. coli* în cursul a 328 de subculturi, făcute în interval de peste 30 de ani. Transmiterea stării de rezistenţă se face însă prin transmiterea parazitului. Acesta se integrează în celula colibacilului şi se transmite la descendenţi o dată cu ceilalţi factori care caracterizează specia. Parazitul a fost, într-adevăr, mereu prezent în cele 328 de culturi făcute de M. Ciucă, el putînd fi pus în evidenţă prin metode obişnuite folosite în studiul bacteriofagiei.

Celulele purtătoare de bacteriofag sînt rezistente şi rezistenţa lor se datoreşte tocmai faptului că sînt purtătoare. In momentul în care pierd parazitul, celulele devin sensibile, se îmbolnăvesc, se lizează şi, în mare parte, mor. Parazitul se găseşte în celula rezistentă sub formă de „probac-

teriofag" sau „fag simbiotic", formă inactivă atît timp cît starea fiziologică a celulelor este normală ; intervenind însă cu un factor care are o acţiune nocivă asupra celulei bacteriene, cum ar fi, de exemplu, razele ultraviolete, echilibrul se rupe, probacteriofagul inactiv se transformă în element activ, celula bacteriană se îmbolnăveşte şi moare. Asemenea raporturi se întîlnesc şi între animalele superioare şi diverşi microbi. Purtătorii de bacili ai tuberculozei, de exemplu, pot face o tuberculoză clinică atunci cînd echilibrul lor fiziologic este tulburat prin intervenţia unor factori de mediu.

Stări de imunitate se întîlnesc şi la plantele superioare. Tr. Săvulescu (1936), pe baza cercetărilor proprii şi a unui material bibliografic imens, conchide că imunitatea lumii vegetale faţă de bacterii şi alţi agenţi infecţioşi este un fapt care nu mai poate fi pus la îndoială, că plantele se apără faţă de microbi prin sisteme analoage celor întîlnite la animale, că zooimunitatea nu diferă esenţial de fitoimunitate, că formele de imunitate naturală şi dobîndită, întîlnite la animale, se găsesc şi la plante, şi că produsele biologice şi-ar putea găsi aplicaţii în prevenţia şi tratamentul infecţiilor vegetale.

Aceste date, aşa cum remarcă Tr. Săvulescu, permit să se facă o sinteză asupra patogenezei bolilor animale şi vegetale, considerate din punct de vedere unitar, în cadrul general al patologiei comparate.

In concluzie, imunitatea trebuie considerată ca un fenomen general şi caracteristic materiei vii.

Scanned with OKEN Scanner

PRINCIPII DE CHIMIOTERAPIE A INFECȚIILOR BACTERIENE

Încercări de a trata infecțiile prin substanțe chimice s-au făcut încă înaintea identificării diverșilor agenți microbieni.

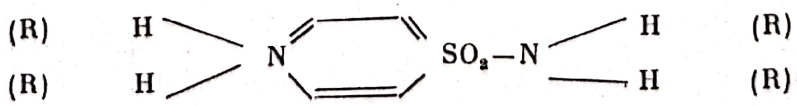
Dacă, în unele boli parazitare (malaria, piroplasmoze, sifilis) s-au obținut rezultate însemnate, în cele bacteriene rezultatele au fost, inițial, puțin satisfăcătoare.

Un pas important, în chimioterapia bacteriozelor umane și animale, s-a realizat prin descoperirea sulfamidelor, un al doilea și poate hotărîtor, prin descoperirea antibioticelor.

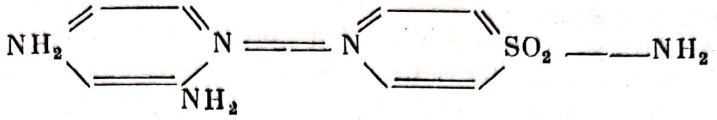
SULFAMIDELE ȘI SULFAMIDOTERAPIA

Unele infecții bacteriene pot fi cu succes prevenite sau tratate prin produse biologice. Prevenția tetanosului la om și animale, prevenția și tratamentul rujetului la porci, al cărbunelui la diverse animale domestice etc. se poate face prin seruri și vaccinuri. Alte infecții însă, deși provocate de germeni cu caractere net bacteriene cum sînt stafilococul, streptococul, gonococul etc. nu pot fi prevenite sau tratate cu deplin succes prin mijloace biologice. Chimioterapia făcea în această direcție eforturi, care au dus în cele din urmă la descoperirea întîi a sulfamidelor și apoi a diverselor antibiotice.

Efectul antibacterian al sulfamidelor a fost descoperit, în 1935, de Gerhard Domagk. Sulfamida folosită, în primele experiențe, a fost o sulfamido-crizoidină, compus colorat, sintetizat de Mietsch și Klarer în 1932 și numit prontozil. Această substanță, ca toate sulfamidele, derivă dintr-o moleculă fundamentală, paraaminobenzensulfamida. În această moleculă, hidrogenii grupelor aminice și sulfamidice pot fi înlocuiți cu diverși radicali, obținîndu-se astfel diverse substanțe, așa cum se vede în formulă.

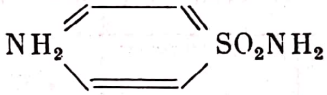


Prontozilul are următoarea formulă :



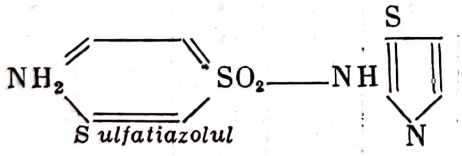
şi este deci 4-sulfamido-2,4 — diaminobenzen.

Tot în anul 1935, soţii Trefouél şi colaboratorii, ocupîndu-se de acţiunea antibacteriană a prontozilului, fac o descoperire care a fost hotărîtoare pentru evoluţia sulfamidoterapiei. Ei găsesc că elementul activ al prontozilului nu este întreaga moleculă, ci numai nucleul sulfamidic care ia naştere în organism prin dedublarea moleculei azoice. Plecînd de la această constatare care este, de altfel, generală şi se aplică multor agenţi chimioterapici (în molecule de atoxil, de exemplu, arsenul este pentavalent şi inactiv şi el este redus, în organism, în arsen trivalent, activ), autorii prepară sulfamidele albe mai active şi mai puţin toxice decît prontozilul. Primul produs experimentat de aceşti cercetători a fost paraminobenzensulfonamida sau sulfanilamida, avînd următoarea formulă :

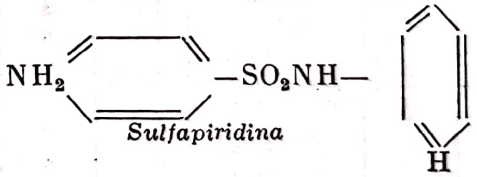


Plecîndu-se de la aceste date fundamentale, s-au descoperit o serie întreagă de produse chimice cu activitate antibacteriană evidentă. Din punct de vedere chimic, aceşti produşi se pot împărţi în două grupe, după cum se înlocuiesc, cu radicali, hidrogenii funcţiei paraaminice sau pe cei ai funcţiei sulfamidice.

Prin înlocuirea hidrogenilor din gruparea paraaminică au rezultat produşi azoici ca : prontozilul solubil, prontozilul rubrum sau rubiazolul (substanţă colorată bazică), septazina, soluseptazina etc. Prin înlocuirea hidrogenilor din gruparea sulfamidică a luat naştere un alt grup de substanţe ca : albucidul (4-aminofenilsulfanilacetamină), sulfapiridina [2-(paraminobenzensulfonamido) - piridină], sulfatiazolul [2 — paraamino-



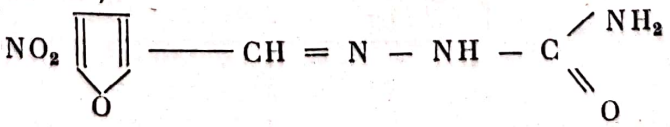
Sulfatiazolul



Sulfapiridina

benzensulfonamido) -tiazol], marfanilul (paraaminometilbenzensulfamidă), ulironul sau diseptalul A (paraaminobenzensulfamidparafenildimetilsulfamida), neoulironul sau dispetal B (derivatul monometilat al ulironului — paraaminobenzensulfamidoparafenilmetilsulfamida), uliron C sau diseptol C (derivatul monometilat al ulironului), sulfaguanidina anil, sulfadiazina [2 - (paraaminobenzensulfamido) pirimidina] etc.

In afară de sulfamide s-au găsit şi substanţe cu o compoziţie chimică diferită, care sînt dotate cu o activitate antiinfecţioasă. O asemenea substanţă şi care se foloseşte în ţara noastră este nitrofuranul (5- nitro 2 -furaldehidsemicarbazona).



B a l ş a arătat că această substanţă are un spectru de activitate foarte întins şi cuprinde în el coci şi bacterii Gram negative. Rezultate pozitive

s-au obţinut mai cu seamă în febra tifoidă umană, care este produsă de o *Salmonella* şi anume *S. typhosa.*

Experimental şi clinic, sulfamidele sînt active într-o serie de infecţii cum sînt cele stafilococice, streptococice, pneumococice, gonococice, meningocoice, dizenterice, pasteurelice (la animale), precum şi în gangrenele gazoase. Infecţia morvoasă la cobai, aşa cum a arătat Munţiu (1943), poate fi prevenită printr-un tratament convenabil cu sulfatiazol. Dima, Isopescu şi Sîrmon au arătat, mai departe, că chiar cobaii cu simptome clinice de morvă pot beneficia de un tratament cu sulfatiazol.

Activitatea antibacteriană şi antiinfecţioasă a sulfamidelor este, de cele mai multe ori, excepţional de puternică. Iată, cu titlu de exemplu, prima experienţă făcută de Domagk, în 1932, privitor la acţiunea antistreptococică a prontozilului în infecţia experimentală a şoarecelui.

Tabelul 42

Şoareci infectaţi intraperitoneal cu *0,3* ml din diluţia *1/1 000* a unei culturi de streptococ în bulion cu ou şi trataţi cu prontosil per os la *1/2* oră după infecţie

Nr. şoarecelui	Greutatea	Preparatul folosit	Doze în ml	REZULTATUL							
				21 XII	22 XII	23 XII	24 XII	25 XII	26 XII	27 XII	28 XII
303	18	Prontozil rubrum, 0,01%	0,2	s	s	s	s	s	s	s	s
304	19		0,2	s	s	s	s	s	s	s	s
305	18		1,0	s	s	s	s	s	s	s	s
306	14		1,0	s	s	s	s	s	s	s	s
307	16	Prontozil rubrum, 0,1%	0,2	s	s	s	s	s	s	s	s
308	15		0,2	s	s	s	s	s	s	s	s
309	17		1,0	s	s	s	s	s	s	s	s
310	17		1,0	s	s	s	s	s	s	s	s
311	14	Prontozil rubrum, 1,0%	0,2	s	s	s	s	s	s	s	s
312	17		0,2	s	s	s	s	s	s	s	s
313	18		1,0	s	s	s	s	s	s	s	s
314	14		1,0	s	s	s	s	s	s	s	s
315	18	Martori	—	s	b	+					
316	16		—	s	+						
317	15		—	s	+						
318	14		—	s	+						
319	15		—	s	+						
320	14		—	s	+						
321	15		—	s	+						
322	17		—	s	+						

Legendă
s = sănătos
b = bolnav
\+ = mort

Valoarea antiinfecțioasă a sulfamidelor rezultă și din tabelul 43, în care sînt date rezultatele activității antipasteurelice a sulfatiazolului (după N. Stamatin, V. Georgescu, și S. Luscalov, 1944).

Tabelul 43

Activitatea sulfatiazolului în infecția cu Pasteurella animalium var, avium la găină

Nr. găinei	Doza de sulfatiazol administrată în g	Calea de administrare	Administrarea sulfamidei în raportul cu momentul infecției	Numărul de d. l. m. injectate	Rezultatul
1	0,5	Per os	După 4 ore	10^{-8}	Rezistă
2	0,5			10^{-8}	
3	0,5			10^{-8}	
4	0,5	Per os	După 15 ore	10^{-8}	Moare în 48 ore
5	0,5			10^{-8}	Moare în 10 zile
6	0,5			10^{-8}	Rezistă
7	0,5	Per os	Imediat	10^{-4}	Rezistă
8	0,5			10^{-4}	
9	0,5			10^{-3}	
10	0,5			10^{-3}	
11	0,25			10^{-2}	
12	0,25			10^{-2}	
13	0,125			10^{-2}	
14	0,125			10^{-2}	
15	1			10^{-1}	Moare în 4 zile
16	1			10^{-1}	Moare în 5 zile
17	Martor	—	—	10^{-10}	Rezistă
18		—	—	10^{-9}	Moare în 3 zile

SPECTRUL BACTERIOSTATIC

Sulfamidele, așa cum au arătat numeroase cercetări, sînt active în infecțiile produse de unele bacterii. Virusurile și rickettsiile nu sînt, în general, sensibile. Unele viroze care se complică prin infecții produse de bacterii sulfamidosensibile pot fi însă favorabil influențate de sulfamide. Astfel, au fost obținute rezultate pozitive în tratamentul jigodiei, gastroenteritei pisicilor, febrei tifoide a calului, febrei aftoase, corizei gangrenoase a bovideelor etc.

Eficacitatea tratamentului este în funcție de doză, sensibilitatea germenului, intensitatea infecției și starea generală a organismului infectat.

Doza trebuie să fie suficientă și administrată în așa fel încît să se atingă, cît mai repede în sînge o concentrație activă, care este în medie de 2 mg pentru 100 ml de sînge. Această concentrație trebuie realizată chiar

de la începutul tratamentului, menţinută prin administrări repetate şi făcute la cîteva ore interval, atît timp cît durează infecţia şi încă 1—2 zile după dispariţia temperaturii. Se renunţă la tratament şi se trece la o altă medicaţie, cînd, după o aplicare de 3—4 zile, nu se obţine nici un fel de ameliorare a stării generale, ceea ce indică că infecţia nu este produsă de un germen sulfamidosensibil. Dozele care realizează concentraţii active în sînge sînt de 0,06 g pe kilocorp pentru cîine, 0,10 g pe kilocorp pentru cal şi 0,15 g pe kilocorp pentru bou. Ţinînd seama că între doza terapeutică şi toxică există o diferenţă remarcabilă, acest dozaj poate fi depăşit atunci cînd infecţia are o evoluţie gravă şi agentul etiologic o sensibilitate redusă faţă de sulfamide. Depăşirea dozei minime active, mai ales în prima perioadă de tratament, este necesară şi în scopul de a evita crearea raselor sulfamidorezistente. Bacteriile, avînd o însemnată plasticitate, se transformă în contact cu sulfamidele, în variante insensibile faţă de acţiunea nocivă a acestor compuşi. Crearea raselor sulfamidorezistente a fost demonstrată experimental de numeroşi cercetători, atît in vitro cît şi in vivo şi ea pare a fi specifică, în sensul că rezistenţa creşte faţă de compuşii sulfamidici, dar nu şi faţă de alte produse antibiotice.

Calea de administrare a sulfamidelor poate fi bucală, parenterală sau prin aplicaţii locale. Prima administrare este recomandabil să se facă cu o soluţie adevărată şi sterilă, pe cale intravenoasă, deoarece pe această cale se realizează cel mai repede difuziunea medicamentului în sînge. Următoarele administrări se pot face pe cale subcutanată, intramusculară sau per os. Aplicaţiile locale se fac cu pulberi sau pomezi.

MECANISMUL ACŢIUNII ANTIBACTERIENE A SULFAMIDELOR

Activitatea antiinfecţioasă a sulfamidelor părea, iniţial, paradoxală, pentru motivul că primul produs descoperit şi experimentat era lipsit, in vitro, de însuşiri antibacteriene. Astfel, soluţiile 1/100 de prontozii nu omorau streptococii dintr-o suspensie nici în cîteva ore. Mai mult încă, s-au făcut, cu o tulpină de streptococ, 18 treceri în bulion cu prontozil în diluţie de 1/10 000, fără să observe în aceste condiţii, vreo alterare oarecare a virulenţei germenului. Acest paradox nu era decît aparent şi, de altfel, uşor de explicat. Într-adevăr aşa cum s-a arătat mai sus activitatea antiinfecţioasă a prontozilului nu era datorită întregii sale molecule, ci numai moleculei de paraaminobenzensulfamidă, care rezultă în organism, dar nu în mediile de cultură, prin dedublarea prontozilului. Or, paraaminobenzensulfamida are însuşiri bacteriostatice nu numai in vivo, dar şi in vitro.

Acţiunea bacteriostatică in vitro a sulfamidelor s-a dovedit a fi, pentru unele bacterii, remarcabilă. Multiplicarea gonococului este oprită, de exemplu, de concentraţii mici de sulfamide, 1/320 000. Bacilul morvei este, la fel, inhibat în dezvoltarea sa de o concentraţie de 1/1 000 000 sulfatiazol (Munţiu şi Nemţeanu) şi de 1/100 000 de metilsulfatiazol. *Pasteurella animalium var. avium* este împiedicată să se multiplice de o diluţie de 1/500 000 sulfatiazol, cu condiţia ca numărul germenilor însămînţaţi să fie mic. O concentrare mai mare a sulfamidei poate însă inactiva însămînţări mai abundente. Fapt important de semnalat este că însămînţările prea abundente nu pot fi oprite nici chiar de concentraţii relativ mari de sulfamidă. Astfel, pentru *Pasteurella animalium,* concentraţiile de 1 mg% sau 50 mg% se comportă la fel; ele nu pot împiedica dezvoltarea în cazul cînd în

10 ml de bulion sulfamidat s-a adăugat 1 milion de germeni. Însămînțările, în medii sulfamidate, în aceeași proporție, însă făcute cu 100 000 de germeni pentru 10 ml de bulion, rămîn sterile (N. Stamatin). Constatări similiare a făcut N. Munțiu pentru bacilul morvei.

Activitatea antistreptococică, în vitro, a sulfanilamidei este de asemenea în funcție de concentrația principiului activ. Astfel, 10 mg% sulfamidă împiedică multiplicarea unui număr redus de germeni; o concentrație de 1 g% nu oprește dezvoltarea a 300 milioane de germeni pe 1 ml, dar este activă față de o însămînțare de 10 ori mai mică.

Pe lîngă concentrația germenilor însămînțați și concentrația sulfamidei în mediul de cultură, mai sînt și alți factori care condiționează activitatea bacteriostatică a sulfamidelor. Astfel, la o temperatură ridicată, 38—40°C, acțiunea bacteriostatică este mult mai manifestă ca la o temperatură mai scăzută, 20—30°C. La pH=7, sulfamida este de cinci ori mai activă, față de unii germeni, ca la pH=3,5. Astfel *Escherichia coli și Aspergillus niger* sînt, mai puțin sensibili față de sulfamide în mediu acid ca în mediu neutru. Unele sulfamide sînt mai active pentru unele specii bacteriene ca pentru altele. Sulfanilamida, de exemplu este activă față de streptococii hemolitici, pneumococii de tipul I și II, dar este lipsită de orice activitate bacteriostatică, in vitro, față de salmonele și bacilii dizenteriei. Germenii din grupul *Salmonella* ca și bacilii dizenteriei sînt însă sensibili față de acțiunea bacteriostatică a altor sulfamide ca sulfapiridina, sulfatiazolul etc.

Bacteriile sulfamidosensibile, așa cum s-a arătat mai sus, se dezvoltă, chiar în medii care conțin această substanță bacteriostatică în concentrații importante, dacă sînt abundent însămînțate. In cazul pasteurelei, densitatea culturii în tuburile cu sulfamidă este aceeași ca și în cele lipsite de acest produs, iar germenii care s-au dezvoltat într-un bulion cu o concentrație însemnată de sulfamidă și au rămas chiar cîteva zile în contact cu medicamentul nu au pierdut nimic din puterea lor patogenă. Forma pasteurelelor este uneori modificată și anume bacteriile sînt mult mai mari și mai vacuolizate ca de obicei. Această tumefiere a celulei, sub influența sulfamidelor, a fost semnalată și la unii flagelați la care volumul celulei era de patru ori mai mare în medii cu sulfamidă ca în cele fără sulfamidă. Această transformare a celulei nu este, în cazul pasteurelei, transmisibilă, ceea ce arată că germenul nu a suferit, prin acest contact, modificări în substratul său ereditar. Cercetătorii au încercat să explice aceste hipertrofii celulare. Unii din ei admit, pentru a explica acest proces, că sulfamida nu oprește procesul de asimilare, ci pe cel de diviziune; flagelatul studiat nu pierde, într-adevăr, în prezența sulfamidei, nici unul din caracterele sale vitale în afară de puterea de multiplicare; el este mobil și apt să înceapă să se dividă îndată ce acțiunea sulfamidei este neutralizată printr-o substanță oarecare; sulfamida ar bloca deci capacitatea de multiplicare a germenilor, dar nu puterea lor de asimilare: celulele cresc, își amplifică volumul, dar nu se pot divide.

La unele specii bacteriene s-au putut pune în evidență, sub influența sulfamidelor, unele modificări morfologice și fiziologice mai importante.

Scanned with OKEN Scanner

Ivanova a observat, de exemplu, că streptococul scarlatinei produce, pe agarul sulfamidat, colonii mucoase. Aceste variante mucogene au pierdut însuşirea de a fermenta glucoza şi manita.

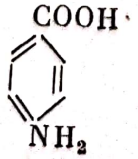
Aspectul cocilor se modifică şi el prin cultivare în prezenţa sulfamidei. E. Angelescu şi colaboratorii (1951) constată că, în prezenţa sulfamidei (250—500 mg de sulfatiazol la 100 ml de mediu), streptococii îşi măresc dimensiunile foarte mult, nu se mai dispun în lanţuri lungi, îşi prelungesc faza de adaptare şi îşi reduc capacitatea fermentativă faţă de glucoză. În acelaşi sens, Dîmboviceanu şi Vainer (1950) constată că, în prezenţa sulfatiazolului, activitatea lipazelor streptococice este parţial inhibată.

Acţiunea inhibitoare a sulfamidelor poate fi neutralizată in vitro, şi după unii autori şi in vivo, prin diverse substanţe. Peptona, de exemplu, a fost cercetată printre primii produşi şi s-a găsit că ea inactivează sulfamidele. S-au studiat apoi o serie de substanţe cu acţiune antagonistă faţă de sulfamide, constatîndu-se că extractul de drojdie de bere este, din acest punct de vedere, cel mai activ. În acest extras, fapt important, s-a identificat însuşi produsul inhibitor activ şi anume vitamina H sau acidul paraaminobenzoic, care este un factor indispensabil de creştere pentru o serie de bacterii (Wood, 1940).

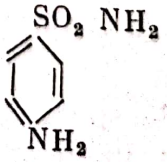
Acţiunea inhibitoare a acidului paraaminobenzoic se exercită în doze foarte mici. O moleculă de acid paraaminobenzoic inactivează, de exemplu, 10 molecule de sulfadiazină, 100 de sulfamidopiridină şi 500 de paraaminofenilsulfamidă. Acţiunea antisulfamidică a acestei vitamine este strict specifică. Izomerii săi din poziţia orto şi meta nu pot să-l înlocuiască, chiar în concentraţii de 2 000 de ori mai mari. Paraaminobenzamida şi esterul acidului paraaminobenzoic au, de exemplu, o activitate antisulfamidică mult mai redusă. După unii cercetători, acidul paraaminobenzoil-glutaminic ar fi de 8—10 ori mai activ ca acidul paraaminobenzoic, fiind, în acelaşi timp, suportat de bacterii în doze mari.

Acţiunea antisulfamidică a acidului paraaminobenzoic este uşor de pus în evidenţă. Astfel, dacă sîngele unui septicemic, tratat cu sulfamide, este însămînţat pe două plăci cu agar nutritiv din care una conţine vitamină H, se constată că numărul coloniilor ce se dezvoltă este mult mai mic în placa lipsită de vitamina H, decît în aceea care o conţine. Sulfamida care se găsea în sînge a inhibat dezvoltarea germenilor în prima placă, dar ea nu a exercitat această acţiune inhibitoare în placa a doua, în care exista acidul paraaminobenzoic.

Mecanismul acţiunii neutralizante a acidului paraaminobenzoic nu este încă complet lămurit. Unii cercetători admit că la baza acestei acţiuni este un proces de mimetism biologic. Se afirmă, în acest sens, că celula bacteriană pentru care vitamina H este un factor de creştere esenţial nu poate distinge cele două substanţe din cauza similitudinii formulelor lor chimice şi ea integrează în sistemul său fermentativ sulfamidele în acelaşi fel ca şi acidul paraaminobenzoic. Pentru acest motiv sulfamidele mai sînt numite şi antagonişti metabolici.



Acidul paraaminobenzoic



Paraaminobenzensulfamida

Sulfamidele însă nu numai că nu pot suplini acidul paraaminobenzoic în funcțiunile sale metabolice, dar, dimpotrivă, integrate în sistemul fermentativ al celulei, ele blochează procesele nutritive, împiedicînd diviziunea celulară. În prezența acidului paraaminobenzoic, sulfamidele nu au o eficacitate totală, deoarece unele bacterii își integrează în sistemul lor fermentativ acidul și pot, în consecință, să se multiplice. În acest fel se explică de ce în plăcile cu agar și acid paraaminobenzoic, în experiența citată mai sus, numărul coloniilor este mult mai mare în placa cu acid paraaminobenzoic decît în aceea în care acest compus lipsește.

Acidul paraaminobenzoic nu este însă singurul antagonist al sulfamidelor. O dovadă, în acest sens, se găsește în constatarea că sulfamidele sînt active și față de speciile bacteriene pentru care acidul paraaminobenzoic nu este un metabolit esențial. O asemenea specie pare să fie *Pasteurella animalium* la care efectul bacteriostatic al sulfamidelor nu este neutralizat de acidul paraaminobenzoic.

Dacă, în vitro, mecanismul acțiunii sulfamidelor asupra bacteriilor pare parțial lămurit, în vivo, acest mecanism este mult mai complicat. Să notăm deocamdată că D o m a g k, în vivo, nu a putut obține o neutralizare a acțiunii antiinfecțioase a sulfamidelor prin acidul paraaminobenzoic. După acest autor, organismul joacă, alături de sulfamide, un rol tot așa de esențial ca și ele în jugularea unei infecții. Se pare, după unele experiențe, că sulfamidele ar neutraliza unele funcțiuni agresive sau de apărare ale germenilor patogeni și odată aceste funcțiuni neutralizate, germenii ar deveni o pradă ușoară pentru elementele care execută fagocitoza. În acest sens, următoarea experiență este foarte demonstrativă. Se inoculează, la șoareci sulfamidați, streptococi incluși în agar. Scurt timp după introducerea streptococilor, se formează în jurul agarului care îi include o zonă de leucocite care împiedică difuzarea streptococilor în organism. La șoarecii nesulfamidați nu se formează, în jurul focarului, o zonă leucocitară asemănătoare și streptococii difuzează în organism și produc infecția. Faptul că la șoarecii sulfamidați se constituie o zonă leucocitară în jurul focarului se explică prin aceea că secrețiile antileucocitare ale germenului patogen au fost neutralizate de medicament. Sulfamidele s-ar comporta deci ca și serurile. Ele dezintoxică bacteriile și le transformă astfel în saprofiți ușor fagocitabili. Această acțiune neutralizantă a fost pusă în evidență și în alte experiențe. Astfel, s-a constatat că în plăci cu sînge și cu uliron streptococul se multiplică, dar nu produce hemolizine. L e v a d i t i a observat că unele endotoxine bacteriene pot fi neutralizate de către sulfamide. Același autor, în același sens, observă că sulfamidele pot altera funcțiunea capsulogenă a unor bacterii.

În concluzie, sulfamidele nu alterează substanța celulei bacteriene, dar pot inactiva unele substanțe care au un rol esențial, fie în nutriția ei — cazul acidului paraaminobenzoic — fie în apărarea ei — tulburarea funcțiunii capsulogene, neutralizarea agresinelor etc. Bacteriile patogene devin, în prezența sulfamidelor, o pradă ușoară pentru elementele naturale de apărare de care dispune organismul.

Organismul sulfamidat ia o parte activă în distrugerea microbilor și urmele acestei activități se traduc prin imunitatea pe care o lasă în urma ei o infecție care a fost tratată prin sulfamide. Într-adevăr, așa cum a arătat, printre alții, N. S t a m a t i n și colaboratorii (1944), găinile infectate

Scanned with OKEN Scanner

cu *Pasteurella animalium var. avium* şi tratate cu sulfamide păstrează, după vindecare, o imunitate solidă. În acelaşi sens, se pot cita şi constatările făcute de N. Dumitrescu şi Sp. Constantinescu (1944—1947) cu privire la formarea anticorpilor în organismele sulfamidate. Iepurii sulfamidaţi produc anticorpi antitifici în aceleaşi condiţii ca şi cei normali.

TOXICITATEA SULFAMIDELOR

Sulfamidele tulbură profund metabolismul şi ritmul de multiplicare a celulelor bacteriene, dar se arată lipsite de nocivitate faţă de celula animală, şi, în orice caz, doze vătămătoare pentru bacterii sînt perfect suportate de organism.

Domagk a arătat, în acest sens, că leucocitele rămîn vii şi active în concentraţii de 10 sau chiar 100 de ori mai mari decît cele nocive faţă de bacterii. În acelaşi sens, s-a constatat că culturile de ţesuturi reuşesc tot aşa de bine în prezenţa ca şi în absenţa sulfamidelor. Aceste însuşiri deosebesc sulfamidele de antisepticele cunoscute care sînt, în general, egal de nocive pentru celula bacteriană sau animală. Astfel, tripaflavina este activă faţă de unele microorganisme, dar ea distruge leucocitele chiar în diluţii de 1/800 000.

Administrarea sulfamidelor, în cantităţi care depăşesc mult dozele terapeutice, poate produce însă fenomene de intoxicaţie atit la om cît şi la animale. Dozele toxice au fost stabilite pentru aproape toate animalele de experienţă. Şobolanul şi iepurele suportă perfect, 0,5 g de prontozil pe 1 kg de greutate vie. La şoarece se pot administra, pentru aceeaşi greutate corporală, doze de două ori mai mari. Diversele sulfamide nu sînt egal de toxice. Prontozilul, de exemplu, este toxic pentru cîine, în special unii indivizi sînt foarte sensibili. Ulironul este foarte puţin toxic şi la animale se pot administra doze mari (şoarece 2—20 g pe 1 kg, iepure 5 g pe kg, pisică 4 g pe 1 kg) fără a putea observa tulburări funcţionale. Sulfapiridina şi sulfatiazolul se comportă aproape la fel ca şi ulironul. În general, se constată diferenţe în ceea ce priveşte toxicitatea diverselor sulfamide pentru aceeaşi specie animală. Astfel, la şoarece, s-au stabilit următoarele doze letale pentru cîteva sulfamide mai uzuale:

sulfatiazolul	1,32 g pe 1 kg
sulfametiltiazolul	0,8 g pe 1 kg
sulfaetiltiazolul	0,23 g pe 1 kg
sulfafeniltiazolul	0,46 g pe 1 kg
sulfapiridina	0,81 g pe 1 kg

Sulfamidele, administrate în doze toxice, produc leziuni hepatice, renale şi nervoase. În ficat se pot observa degenerări grase şi, în unele cazuri, zone necrotice. Rinichiul poate prezenta, fie alterări trecătoare ale epiteliului, fie uşoare infiltraţii. În anumite cazuri şi mai ales la speciile animale care acetilează sulfamidele se pot produce calculi care pot obstrua ureterele şi duce la hidronefroze şi uremie. Leziunile nervoase constau, în special, din inflamaţia nervilor periferici. Asemenea leziuni se întîlnesc mai frecvent la găini. În condiţii experimentale s-a studiat acţiunea diverselor sulfamide (prontalbinul, sulfapiridina, ulironul, sulfatiazolul, sulfametiltiazolul şi sulfonfeniltiazolul) asupra ţesutului nervos al puilor tineri (de 8—26 de săp-

Scanned with OKEN Scanner

tămîni), administrîndu-se, per os, doze de 0,5 — 1 g zilnic, timp de 1—2 săptămîni. Prontalbinul, în aceste condiții, dă cea mai mare concentrație în sînge, fiind în același timp cel mai puțin nociv pentru țesutul nervos. Sulfapiridina, sulfatiazolul ca și celelalte produse provoacă leziuni nervoase importante, care constau din vacuolizarea și fragmentarea axonilor. În același timp, se produc leziuni în creier ca și în măduva spinării.

Administrarea unor doze importante de sulfamidă poate produce, în sînge, pe socoteala hemoglobinei, methemoglobină și verdohemochromogen. În timp ce primul produs dispare repede, cel de al doilea este un produs ireversibil și rămîne mult timp în sînge. În unele cazuri, s-a observat o înmulțire a cantității de hemosiderină din sînge. Numărul eozinofilelor din măduva osoasă se poate mări sub influența sulfamidelor. La om, în cursul unui tratament prelungit, se pot observa fenomene de intoleranță. Sulfamidele, administrate per os sau intravenos, pot provoca vomizări. Sulfapiridina produce cel mai frecvent asemenea tulburări gastrointestinale. Datorită prezenței în sînge a methemoglobinei, sulfhemoglobinei — produși ce iau naștere sub influența sulfamidelor — se produc la om, adeseori, fenomene de cianoză. Cianoza methemoglobinică nu prezintă nici o gravitate, ea remediindu-se repede și complet prin injecții intravenoase de albastru de metilen. Producția de verdohemochromogen este mult mai gravă. Unele sulfamide sînt mai periculoase, din acest punct de vedere, decît altele. Astfel sulfanilamida și derivații ei, mai ales diaminodifenilsulfonii și diaminodifenilsulfoxizii, produc aproape regulat, mai ales la om, în urma unei administrări mai îndelungate, fenomene cianotice.

Unele sulfamide ca diseptalul, sulfanilamida și sulfapiridina, pot duce la o agranulocitoză, fenomen grav care poate sfîrși prin moarte. De aceea, administrarea medicamentului trebuie să fie întovărășită de controlul tabloului sanguin. În clinica umană s-au mai putut observa anemii în urma administrării sulfamidelor. Alterările renale pot duce la hematurii, dureri în regiunea lombară, nefrite și chiar uremii.

Fenomene cutanate, ca eriteme scarlatinoforme, morbiliforme, urticariene, papuloase, veziculoase, s-au observat la om în urma unui tratament prelungit. Sulfanilamida, diseptalul sau sulfapiridina pot provoca tulburări din partea sistemului nervos cum sînt durerile de cap, nevrite etc.

Spermatogeneza nu pare a fi tulburată de sulfamide. Spermatozoizii de șobolan își mențin mobilitatea în soluții cu sulfamide tot așa de bine ca și în cele lipsite de aceste produse. Cu totul altfel se comportă, de exemplu, chinina care, chiar în concentrații de 0,2%, îi omoară imediat.

RESORBȚIA, CIRCULAȚIA ȘI ELIMINAREA SULFAMIDELOR

Sulfamidele sînt, în general, greu solubile în apă. La 20°C paraaminobenzensulfamida se solubilizează în proporție de 0,58‰, sulfapiridina 0,5‰, sulfatiazolul 0,6‰. S-au preparat și sulfamide în soluții destul de concentrate, însă aceste soluții sînt foarte alcaline, putînd atinge un pH = 11,4 și, din această cauză, cînd sînt administrate subcutanat sau intramuscular pot produce necroze locale.

Administrarea sulfamidelor în scop terapeutic se face, în general, per os. Coeficientul lor de solubilitate fiind redus, resorbția în circulația generală nu se face dintr-o dată, ci pe măsură ce ele se dizolvă. Trecerea din

Scanned with OKEN Scanner

tubul digestiv în circulaţia generală se face destul de repede şi în majoritatea cazurilor 1 oră după administrarea sulfamidei se atinge în sînge concentraţia maximă. Pe alte căi decît cea bucală sulfamidele nu se administrează decît rar. Se recurge la administrarea rectală atunci cînd bolnavul nu suportă medicamentul per os.

Sulfamidele solubilizate se injectează intravenos în cazul cînd este necesară atingerea rapidă a unei concentraţii ridicate în sînge. Aplicaţia locală sub formă de pomezi se foloseşte foarte mult şi în cele mai diverse stări patologice. Acest mod de aplicare permite să se obţină, în regiunea infectată, o concentraţie de 200—800 mg pentru 100 g de ţesut, concentraţie care nu se poate realiza pe alte căi. Sulfamidele pot întîrzia vindecarea plăgilor, dar, ţinînd seama de faptul că evită infecţiile, folosirea lor nu trebuie să fie înlăturată.

Oricare ar fi calea de administrare, sulfamidele trec în sînge. Această trecere este aproape totală ; la cîine, de exemplu, 99% din doza administrată per os se găseşte în sînge. Sulfamidele greu solubile se pot elimina însă şi prin materii fecale, mai ales cînd doza a fost mare.

Concentraţia medicamentului în sînge variază de la o specie la alta ; şoarecele, dintre speciile cercetate, pare să realizeze cifrele cele mai ridicate. 1 g de septoplix pentru 1 kg de greutate vie dă în sîngele acestui animal, 30—60 de minute după administrare, o concentraţie care depăşeşte 50 mg pentru 100 ml de sînge şi care se menţine timp de 4 ore. La şobolan, cîine, om, nu se pot obţine asemenea cifre. La omul adult, concentraţia maximă este de 10—15 mg% şi se obţine abia după 4 ore de la administrarea per os ; la copii însă resorbţia se face mult mai repede şi cifra concentraţiei maxime este atinsă după 1 oră de la administrare. Concentraţia în sînge variază de sigur şi în raport cu doza. S-a constatat, în această privinţă, că o doză de 2 g de sulfatiazol dă o concentraţie în sînge de 3—4 mg%, una de 3—4 g dă 4—7 mg%, una de 5—6 g, o concentraţie de 6—8 mg%. La păsări — găină — sulfatiazolul se resoarbe destul de repede ; o doză de 0,5—1 g, administrată dintr-o dată, dă în sînge o concentraţie de 4—10 mg%. Aceste cifre se menţin timp de 6 ore, apoi ele scad repede, pentru ca după 24 de ore să nu se mai găsească decît cantităţi foarte mici. Dozele mari de sulfatiazol — 1 g pînă la 1,5 g — produc, la găină, parezii ale guşii, care împiedică total resorbţia medicamentului.

Sulfamidele, administrate pe diverse căi, trec în sînge şi de aici în toate umorile organismului, îmbibînd toate ţesuturile. Ele se găsesc, într-adevăr, în organe ca şi în produsele de secreţie şi excreţie ca bila, sperma, saliva, lapte, urină, sudoare etc. Filtrul placentar este permeabil pentru sulfamide şi concentraţia din sîngele fetal este egală cu aceea din sîngele matern.

Eliminarea sulfamidelor se face, în mare parte, prin urină. La om, de exemplu, 65—88% din sulfamida administrată se elimină pe această cale. Cele mai greu solubile se elimină şi prin fecale. Prezenţa sulfamidelor în materiile fecale se datoreşte nu numai insolubilităţii lor, ci şi eliminării prin bilă. Într-adevăr, dacă se colectează bila înainte ca ea să se verse în intestin, materiile fecale sînt, în general, lipsite de sulfamide. Eliminarea prin bilă este constantă ; chiar concentraţii mici în sînge sînt însoţite de prezenţa sulfamidelor în bilă.

Sulfamidele se pot elimina prin urină, fie ca atare, fie după acetilare. Proporţia de acetilare variază de la o specie la alta. Cîinele şi găina nu acetilează sulfamidele ; omul, iepurele etc. le acetilează. Administrarea

Scanned with OKEN Scanner

de acetilat de sodiu, paralel cu suflamida, mărește proporția produsului acetilat în raport cu cel liber. Unele produse se acetilează mai puțin ca altele. Sulfatiazolul, de exemplu, este mai solubil și mai puțin acetilat ca sulfapiridina. Produsul acetilat poate cristaliza și dă naștere la concremente pe traiectul căilor de eliminare. Acetilarea se face în ficat.

Viteza de eliminare a sulfamidei variază în raport cu specia animală, doza și cu preparatul administrat. Șoarcelii elimină chiar o doză puternică în 2 zile. La om, eliminarea unei singure doze se face mai încet ca la șoarece, dar, în general, după 5—7 zile, toată sulfamida a fost eliminată. La iepure, eliminarea este uneori foarte înceată; astfel, după administrarea a 3 g de sulfapiridină, în trei reprize, medicamentul se mai găsește în urină chiar după 17 zile. Tibatinul, la același animal, se elimină însă foarte repede. Cercetările au arătat că 5 minute după administrarea intravenoasă a unei doze de 0,5 g pe 1 kg, sîngele are o concentrație de 100 mg%, după 20 de minute 60—75 mg%, după 1 oră 50 mg%, iar după 2 ore 33 mg%.

Pentru dozarea sulfamidelor în diverse medii organice vezi lucrările lui V. Georgescu (1945, 1947) sau V. Georgescu și colaboratorii (1947, 1950).

ANTAGONISMUL MICROBIAN. SUBSTANȚELE ANTIBIOTICE

Bacteriile, datorită uimitoarei lor puteri de multiplicare, cît și capacității lor de a folosi, ca surse plastice și energetice, cele mai variate substanțe, sînt foarte răspîndite în natură, ceea ce face ca ele să se întîlnească frecvent în același spațiu nutritiv. Speciile, care ajung în același spațiu, se influențează reciproc și relațiile ce se stabilesc, ca o consecință a acestei conviețuiri, pot fi schematizate în felul următor:

1. Două sau mai multe specii se dezvoltă în același mediu, fără a se influența una pe alta. *Bacillus anthracis,* de exemplu, se dezvoltă în același mediu — bulion — cu bacilul rujetului; mai mult încă, așa cum a arătat P. Riegler și colaboratorii, cele două specii se pot multiplica în același organism, provocînd, de exemplu, la porc, infecții mixte.

2. Două specii se dezvoltă alături în același mediu, completîndu-și deficiențele de sinteză. *Haemophilus canis,* de exemplu, se dezvoltă, împreună și numai împreună cu *H. parainfluenzae,* în apă peptonată; cele două specii își sintetizează una pentru alta factorii de creștere de care fiecare are nevoie și care nu se găsesc în mediu. Asemenea asocieri, întîlnite și la alte grupe de viețuitoare, constituie o simbioză.

3. Prezența unei specii favorizează in vivo sau in vitro multiplicarea altei specii; aerobii, consumînd oxigenul dintr-un spațiu închis, înlesnesc multiplicarea anaerobilor în medii de cultură sau în organismul animal. Astfel, sub membrana constituită de *Bacillus subtilis,* la suprafața bulionului, se dezvoltă bacterii anaerobe cum este, de exemplu, bacilul tetanosului; produșii rezultînd din metabolismul unei specii pot fi utili și condiționează multiplicarea altei specii; bacilii paratuberculoși găsesc, de exemplu, în mediile în care s-au dezvoltat bacilii tuberculozei principii utili creșterii lor; preexistența bacilului tuberculozei într-un mediu creează condiții favorabile bacilului paratuberculos. Relații de acest fel se întîlnesc și la alte viețuitoare, în special la plante, și ele sînt cunoscute sub numele de relații metabiotice, iar fenomenul sub numele metabioză.

4. Unele specii elimină alte specii din mediul în care se cultivă; procesul poartă numele de antagonism. *Actinomyces griseus,* aşa cum a observat Waksman şi colaboratorii, nu tolerează în zona de pămînt în care se dezvoltă prezenţa altor specii; el le elimină şi se dezvoltă în cultură pură. În sol există specii bacteriene care, aşa cum observă Krasilnikov, lizează unele specii de ciuperci patogene pentru plante. Acţiunile antagonice dintre specii sînt foarte frecvente şi au fost observate la multe specii de bacterii, actinomicete, ciuperci şi chiar plante verzi şi medicina a reuşit să folosească aceste antagonisme în tratamentul unor infecţii.

DATE DESPRE ANTAGONISMUL DINTRE SPECII MICROBIENE

Cercetările privind antagonismul microbian sînt vechi şi numeroase. Se afirmă că Manasein şi Polotebnev, încă din anii 1871—1872, au constatat că unele ciuperci inferioare exercită o acţiune destructivă faţă de unele bacterii şi, mai mult încă, ei folosesc aceste ciuperci, sub formă de pansament în tratamentul plăgilor externe. Aceşti doi cercetători ruşi trebuie consideraţi, în consecinţă, printre promotorii folosirii antibioticelor în terapeutica bolilor microbiene. Pasteur şi Joubert (1877) au observat că bacilul cărbunelui nu se dezvoltă în medii lichide (urină neutră sau alcalină) decît în cultură pură; în mediile infectate el nu se multiplică şi asemenea culturi sînt inofensive chiar pentru animalele cele mai sensibile. Autorii relevă importanţa acestei observaţii şi întrevăd însemnătatea ei pentru terapeutica bolilor infecţioase. Babeş face, în 1883, observaţii similare şi afirmă că inhibiţia unei specii prin alta se datoreşte fie modificării mediului de cultură fie secreţiilor pe care o specie le pune în libertate şi care sînt nocive pentru cealaltă. Emmerich şi colaboratorii reiau, în 1887, experienţele lui Pasteur, confirmîndu-le. Streptococul izolat din erizipelul uman s-a dovedit, în mîinile acestor cercetători, un puternic antagonist faţă de bacteridia cărbunelui; inoculat, înainte sau chiar după infecţia experimentală cu *Bacillus anthracis,* el opreşte evoluţia bolii; rezultate bune se obţin de altfel şi inoculînd culturile de streptococ în jurul edemului cărbunos. Însuşiri asemănătoare streptococului sau poate chiar mai accentuate posedă bacilul piocianic; culturile acestui germen, injectate în jurul edemului cărbunos, provocat experimental la cobai sau la iepure, opresc dezvoltarea infecţiei. Blagovescenski (1890) observă, în acelaşi sens, că iepurii inoculaţi intraocular cu un amestec de bacili ai cărbunelui şi bacili piocianici nu mor de cărbune. Mecinikov, studiind flora intestinală şi influenţa ei asupra fiziologiei organismului uman, constată că unele specii, în special cele conţinute de laptele acru, iaurt etc., exercită o acţiune nocivă asupra unor bacterii de putrefacţie din intestin. La şoarecii hrăniţi cu lapte acru, autorul constată, într-adevăr, o înlocuire a florei intestinale cu flora lactică, ceea ce nu se putea realiza decît în urma unei acţiuni antagoniste. Mecinikov face o legătură între natura florei intestinale şi procesele de îmbătrînire. El admite că flora lactică, înlocuind flora obişnuită de putrefacţie, ar contribui la prelungirea vieţii şi ar explica lunga viabilitate a unor oameni care consumă în timpul vieţii lor mult lapte.

Aceste cercetări arată că concurenţa vitală este o realitate în lumea fiinţelor microscopice şi că unele specii elimină pe altele din acelaşi spaţiu

Scanned with OKEN Scanner

nutritiv. Mecanismul eliminării nu este totdeauna același. Uneori eliminarea speciei dominate de către specia dominantă se face pe căi pasive. În mediile lichide, de exemplu, specia care are o viteză de multiplicare mai mare elimină specia cu viteza de diviziune mai mică. N. Stamatin a constatat asemenea dispariții în cazul însămînțării în bulion, a două variante de bacili ai cărbunelui. Cele două variante își tolerează prezența, se multiplică paralel în același tub cu mediu lichid, dar varianta mai puțin prolifică este înlocuită treptat de varianta mai prolifică. La fel, bacilul tuberculozei, din cauza încetei sale multiplicări, nu se dezvoltă în culturi infectate cu germeni prolifici. Inhibiția, în acest caz, nu este datorită numai diferenței de prolificitate, ci și modificării însușirilor inițiale ale mediului — acidifiere, epuizare în principii nutritivi etc.

Fig. 56 — Un actinomicet dezvoltat pe agar (fibre) în apă, la care s-a adăugat o suspensie de stafilococci
În jurul coloniilor de actinomicet s-a produs clarificarea mediului ca o consecință a lizei stafilococilor

Excluderea unei specii din spațiul nutritiv se face, în alte cazuri, în mod activ și se datorește secrețiilor pe care un microorganism le pune în libertate și care sînt nocive pentru alt microorganism. Aceste secreții pot fi naturale, dar ele se pot naște în contact cu substratul, adică în contact cu bacteria respectivă. Schiller (1914, 1923, 1924) a constatat în această privință că prin cultivarea a două specii bacteriene, *Bacillus subtilis* și *Staphilococcus pyogenes,* într-un mediu deficitar în principii nutritivi, se creează condiții optime pentru apariția unui antagonism între cele două specii. În aceste condiții, una din ele reușește să lizeze a doua specie și să folosească ca aliment componenții săi celulari. Această observație constituie ceea ce autorii sovietici numesc antagonismul forțat și pe el se sprijină unii cercetători în încercările lor de a obține, în condiții artificiale, variante antagoniste față de unele specii patogene. Vasilenko (1952), de exemplu, cultivînd bacilul mezenteric împreună cu *Salmonella typhi murium* vie, observă apariția, la primul germen, a unor proprietăți antagoniste față de al doilea germen. Proprietățile astfel cîștigate se pot păstra pînă la 1 an.

Substanțele secretate de diverse viețuitoare și care au proprietatea de a inhiba dezvoltarea altor viețuitoare se numesc, cu un termen generic, antibiotice. Asemenea produse de secreție au fost puse în evidență, pentru prima oară, la *Bacillus pyocyaneus.* Emmerich și Löw (1899) caută principiul responsabil de antagonismul manifestat de această bacterie în filtratele culturilor ei și autorii îi constată, într-adevăr, prezența. Asemenea filtrate lizează unele bacterii in vivo și in vitro și ele pot, astfel, inhiba dezvoltarea unor infecții bacteriene și, în special, infecția produsă de bacteridia cărbu-

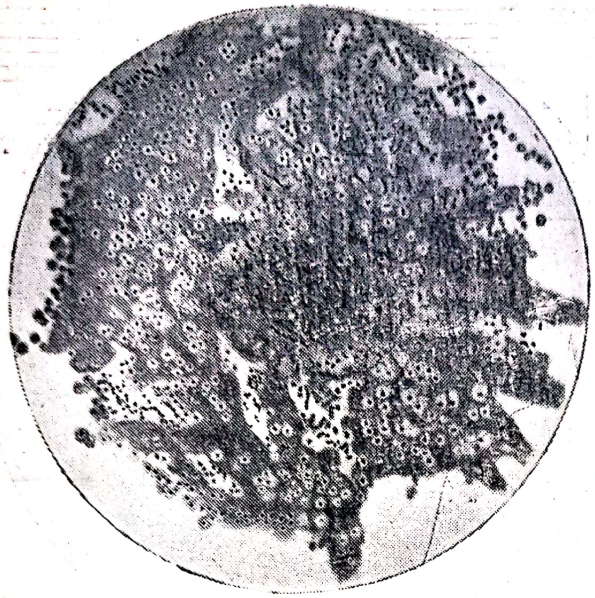


Fig. 57 — Cultură mixtă de stafilococ şi o bacterie Gram negativă

Coloniile de stafilococ s-au dezvoltat în stratul de cultură a germenului Gram negativ, prezentînd în jurul lor o zonă clară de inhibare. Stafiloccii secretă deci un principiu antagonist faţă de bacteria Gram negativă, cu ajutorul căruia îşi creează şi menţine un spaţiu de dezvoltare

nelui. Filtratul culturilor de *B. pyocyaneus* este cunoscut sub numele de piocianază sau piocianină. M. Nicolle (1907) observă, mai departe, că *B. subtilis* se dezvoltă în suspensiile dense obţinute, spălînd cu apă fiziologică culturile pe agar ale unor specii bacteriene cum sînt bacilii morvei, tifosului, cărbunelui şi pneumococii; germenii eterogeni sînt lizaţi — suspensia se clarifică — iar produşii rezultaţi prin liză sînt folosiţi la nutriţia germenilor lizanţi.

Pe aceste constatări se bazează o metodă practică de izolare a germenilor cu activitate litică. Ea constă din folosirea unui gel de agar în apă de robinet la care se adaugă o suspensie a germenilor faţă de care vrem să izolăm specii litice. Mediul astfel preparat este opalescent şi lăsat în contact cu aerul, nu întîrzie să apară pe suprafaţa lui, colonii care lizează germenii şi clarifică mediul. Dintre germenii patogeni, stafilococul şi bacilii cărbunelui sînt folosiţi ca hrană cu cea mai mare uşurinţă, în special de către diverse specii de actinomicete. Actinomicetele izolate prin acest procedeu se dezvoltă în suspensiile în apă ale germenilor respectivi pe care îi lizează.

Filtratul unor culturi bacteriene poate fi şi el litic. Astfel, filtratele culturilor de *Bacillus subtilis* lizează celulele unor specii bacteriene, în special cele de pneumococ. I. Cernea (1932) sub conducerea lui P. Riegler constată, în acelaşi sens, că filtratele culturilor de *Pasteurella* împiedică, in vitro, dezvoltarea pneumococului.

Date cu privire la antagonismul microbian există din abundenţă. Astfel, *Streptococcus equi,* aşa cum a observat Marica, inhibă dezvoltarea colibacilului. Însămînţînd cei doi germeni în cantităţi egale, în acelaşi tub cu bulion, se constată, după 24 de ore, că streptococul s-a dezvoltat suficient de abundent la fundul tubului, dar colibacilul s-a dezvoltat slab şi numai în partea superioară a mediului de cultură. Între cele două straturi de cultură există o zonă clară, o ţară a nimănui, în care bulionul este perfect limpede. Acţiunea inhibitoare a streptococului este totală în vecinătatea imediată a depozitului cultural şi parţială în zonele mai îndepărtate. Antagonismul, în acest caz, este foarte probabil datorit unor substanţe solubile.

N. Stamatin (1948) descrie antagonismul dintre un germen Gram negativ saprofit şi un stafilococ patogen. Ambii germeni au fost izolaţi din amigdalele unui copil. Însămînţaţi împreună, în bulion, bacteria Gram negativă domină, stafilococul devenind din ce în ce mai rar, pentru ca în cele din urmă să dispară. Urmărind fazele acestei dispariţii prin transplantarea culturii mixte pe agar, în plăci Petri, se observă unele fenomene interesante. In prima fază stafilococii formează pe agar, în masa de cultură a

germenilor Gram negativi, colonii înconjurate de un halo clar (fig. 57). Stafilococii secretă deci principii litici activi pentru bacteria Gram negativă și cu ajutorul cărora ei își creează un spațiu în care se dezvoltă. În a doua fază, coloniile de stafilococi sînt rare și înglobate în cele ale germenilor. Gram negativi, constituind colonii mici, înfundate în mediu. În faza a treia stafilococii dispar cu desăvîrșire.

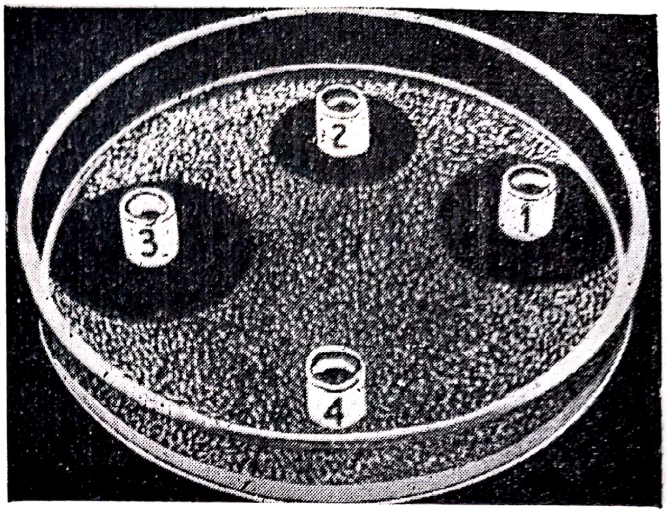


Fig. 58 — Activitatea antibacteriană a plantelor verzi (după **Osborn**)

Tuburile Heatley conțin extrase apoase din: 1 — *Allium sativum*; 2 — *Spiraea aruncus*; 3 — *Ranunculus bulbosus*; 4 — *Prunella vulgaris*

DIVERSE ANTIBIOTICE

În 1939, *Dubos* izolează din culturile unui bacil sporulat care se găsește în pămînt — *Bacillus brevis* — o substanță antibiotică extrem de activă numită tirotricină și care conține doi princiii activi: gramicidina și tirocidina.

Principii antibiotici cu largi aplicații practice s-au obținut apoi din ciuperci inferioare. Penicilina este primul produs de acest fel și s-a ajuns la el plecîndu-se de la observațiile făcute de F l e m i n g, în 1929. Acest cercetător a constatat că pe o placă de agar, în jurul coloniilor de *Penicillium notatum,* coloniile de stafilococ se topesc, germenii suferind procese litice. Filtrînd culturile acestei ciuperci, el constată că filtratul are o acțiune litică nefă asupra stafilococilor ca și asupra altor germeni Gram pozitivi. Plecîndu-se de la un asemenea filtrat, s-a izolat, în 1940, de C h a i n și colaboratorii, penicilina cristalizată care se folosește astăzi pe o scară întinsă în tratamentul diverselor infecții ale omului și animalelor.

Descoperirea penicilinei a constituit punctul de plecare a unor cercetări largi, care au dus la descoperirea unei întregi serii de substanțe antibiotice. În cursul acestor cercetări au fost izolate antibiotice din diverse specii de bacterii, ciuperci, plante verzi și țesuturi animale. Bacteriofagii sînt considerați tot ca substanțe antibiotice. Antibioticele se numesc:

1. bacteriofagi, cînd sînt virusuri filtrabile;
2. bacterine, cînd se extrag din bacterii;
3. micoine, cînd provin din ciuperci;
4. fitoncide, cînd se izolează din plante verzi;
5. zoocide, cînd se găsesc în țesuturile animale.

Folosirea unui număr mare de antibiotice este necesară din cauză că un antibiotic nu cuprinde în sfera sa de activitate toate speciile microbiene patogene, ci numai o parte din ele. Această parte este pentru unele antibiotice mai mare, pentru altele mai mică. Particularitatea pe care o are un antibiotic de a cuprinde în sfera sa un număr anumit de specii este cunoscută și sub numele de *spectru bacteriostatic.* Este de dorit ca medicina să ajungă în posesia unui antibiotic care să cuprindă, în spectrul său bacte-

riostatic, toate microorganismele patogene. Pînă atunci antibioticele își completează unul altuia spectrele bacteriostatice.

Dăm în tabelul 44 lista principalelor antibiotice izolate pînă în prezent.

Tabelul 44

Principalele antibiotice

Numele antibioticului	Originea antibioticului	Antibioticul este activ față de:	Toxicitate	Proprietăți
1. *Antibiotice extrase din bacterii*				
Bacilina	Bacillus subtilis	Gram +	Toxic	Termostabil. Solubil în apă. Inactiv în sînge
Bacitracina	Bacillus subtilis	Gram + Clostridieni. Gonococi	Netoxic	Solubil în apă Stabil. Natură polipeptidică
Diplococina	Streptococi	Gram +	Netoxic intraveninos și subcutanat	Proteină. Solubil în apă
Eumicina	Bacillus subtilis	Ciuperci Mycobacterium tuberculosis Corynebacterium diphteriae	Toxicitate slabă pentru șoarece	Hemolitic. Conține substanțe stimulante
Hemipiocianina	Pseudomonas aeruginosa	Ciuperci	Toxicitate slabă	Hidroxiphenazină
Iodinina	Chroobacterium iodium	Gram + și Gram — Corynebacterium diphteriae	—	—
Ftiocolul	Mycobacterium tuberculosis	Gram +	—	Solubil
Prodigiosina	Serratia marcescens	Bacillus anthracis	—	Termostabil. Solubil în apă
Piocianaza	Pseudomonas aeruginosa	Gram + și Gram — Corynebacterium diphteriae	Toxicitate variabilă	Termostabil
Piocianina	Pseudomonas aeruginosa	Gram + Ciuperci	Toxicitate mare	Solubil în apă. Termostabil. Pigment albastru
Subtilina	Bacillus subtilis	Gram + și Gram —	Netoxic	Solubil în apă. Sensibil la lumină. Compus instabil
Tirotricina	Bacillus brevis	Gram +	Netoxic	Slab solubil. Stabil. Polipeptid
Gramicidina S	Bacillus brevis (sușa G.B.)	Gram + și Gram —	Toxicitate moderată parenteral	Polipeptid compus din cinci aminoacizi
Polimixina	Bacillus polymixa și Bacillus ascosporus	Gram —	Toxic, în special variantele A. C. și D mai puțin B și E	Polipeptid

2. *Antibiotice extrase din actinomicete*

Numele antibioticului	Originea antibioticului	Antibioticul este activ față de:	Toxicitate	Proprietăți
Streptomicina	Streptomyces griseus	Gram + și Gram — Mycobacterium tuberculosis	Toxicitate slabă oral; mare parenteral	Solubil în apă
Aureomicina	Streptomyces aureofaciens	Streptococi. Pneumococi. Brucele. Virusul limfogranulomatozei inguinale	Foarte puțin toxic	—
Cloromicetina	Streptomyces venezuelae	Gram + și Gram — Rickettsia prowazeki	Toxicitate slabă	Solubil în apă. Stabil

3. *Antibiotice extrase din ciuperci*

Penicilina	Penicillium notatum	Gram + Treponema palidum	Netoxic	Complex organic acid. Instabil. Termolabil. Solubil în apă
Penicilina crustozină	Penicillium crustosum	Gram + și Gram —	Netoxic	Complex acid. Termolabil. Solubil în apă, eter, cloroform, acetat de amil
Patulina	Penicillium patulum	Gram + și ciuperci	—	—
Crizomicina	Penicillium crysogenum	Bacillus tuberculosis, Salmonella typhosa. Puțin activ față de stafilococi	—	—
Penatina	Penicillium notatum	Gram + și Gram —	Toxicitate slabă	Stabil. Solubil în apă. Activ în bruceloza cobaiului
Flavicidina	Aspergillus flavus	Gram +	Toxicitate slabă pe cale subcutanată	Instabil. Solubil
Flavacina	Aspergillus flavus	Gram +	Toxic	Acid. organic. Instabil. Solubil în apă

4. *Antibiotice extrase din plante verzi*

Clorofila	Plante verzi	Gram + și Gram —	Netoxic	Methyl-phytyl diester. Nestabil
Alicina Tomatina	Usturoi Pătlăgele verzi	Gram + Ciuperci	Moderat Toxic parenteral	Instabil Insolubil în apă

5. *Antibiotice extrase de la animale*

Lactenina	Lapte	Gram +	—	Proteină stabilă
Lizosima	Țesuturi animale (albuș de ou)	Gram +	—	Solubil în apă. Enzimă stabilă la căldură
Cerebrozina	Din creierul animalelor	Staphilococcus pyogenes	—	—
Eritrina	Globule roșii	B. difteriei	Netoxic	—

Scanned with OKEN Scanner

ANTIBIOTICE EXTRASE DIN BACTERII

Piocianaza. Emmerich şi Löw (1899) prepară astfel piocianaza: culturi în bulion vechi de 6—7 săptămîni se trec prin filtrul Berkefeld. Lichidul obţinut se reduce la 1/10 prin evaporare în vid; produsul rezultat se dializează prin pergament, pentru a elimina parţial sărurile. În aceste condiţii se obţine un lichid sirupos, de culoare gri-brună care a fost numit piocianază. Piocianaza posedă remarcabile proprietăţi proteolitice; ea lichefiază, într-adevăr, gelatina, caseina, fibrina şi serul coagulat. Celulele unor specii bacteriene, cum sînt bacilii cărbunelui, difteriei şi dizenteriei, gonococul, pneumococul şi streptococul sînt şi ele dizolvate într-un timp care variază de la cîteva minute la cîteva ore. Bratosin (1914) afirmă că piocianaza lizează şi sporii bacilului cărbunelui, iar după Emmerich şi Löw acest principiu distruge, in vitro, toxina tetanică şi difterică.

Piocianaza a fost folosită în terapeutica diverselor infecţii bacteriene ca: antrax, difterie, tetanos, colibaciloză etc. Rezultatele au fost, în general, inconstante. Recent s-a reluat studiul principiilor antibiotici din culturile de bacili piocianici şi s-au identificat unele substanţe netoxice şi active faţă de bacteriile Gram pozitive.

Subtilina. *Bacillus subtilis,* precum şi alţi bacili sporulaţi din pămînt ca *B. mesentericus, B. brevis* etc. au proprietăţi proteolitice importante. *B. subtilis* lichefiază nu numai gelatina, albuşul de ou coagulat, serul coagulat, dar topeşte şi unele culturi bacteriene. Filtratul provenind din culturi de *B. subtilis* în bulion peptonat 2%, incubate timp de 4 zile, la termostat, are şi el unele însuşiri proteolitice. El este inactiv faţă de serul coagulat sau albuşul de ou coagulat, dar lichefiază gelatina, hemolizează globulele roşii de iepure şi lizează printr-un ferment, probabil diferit de gelatinază, în 24 de ore, celulele unor specii bacteriene: pneumococ, colibacil, bacilii morvei etc. Recent, diverşi cercetători au reluat problema activităţii antibiotice a filtratelor de *Bacillus subtilis.* Ei au constatat că în mediul Sauton, precum şi în unele medii care au la bază tărîţe de grîu, *B. subtilis* se dezvoltă punînd în libertate o cantitate importantă de gelatinază, pînă la 10 000 unităţi într-un mililitru, precum şi unii principii bacteriostatici, bactericizi şi bacteriolitici. Astfel, 1 ml de filtrat opreşte dezvoltarea şi omoară germenii — bacilii cărbunelui sau difteriei — conţinuţi într-un amestec constituit din 4 ml de bulion şi 0,1 ml de cultură în bulion de 24 de ore. Volumul de 0,5 ml de cultură în bulion de bacili ai cărbunelui este lizat de 1 ml de filtrat subtilic; suspensia, iniţial tulbure, se clarifică. Filtratul culturilor de *B. subtilis* distruge puterea patogenă şi activitatea antigenică a toxinelor tetanică, difterică şi stafilococică. El este puţin activ faţă de toxina botulinică şi complet inactiv faţă de toxinele vegetale (abrina) sau animale (otrava şerpilor). Filtratele, provenind din culturi vechi de *B. subtilis,* inactivează in vitro virusul rabic şi virusul encefalomielitei cailor. Bugeac (1952) a arătat, în acelaşi sens, că filtratul subtilic neutralizează, in vitro, virusul maladiei lui Aujeszky.

Capacitatea antibiotică şi antitoxică (antidotică) a subtilinei nu este alterată prin încălzire; temperaturile de 125—130°C nu o distrug complet, deşi gelatinaza este inactivată la 70°C. Formolul, în proporţie de 0,1%, nu influenţează proprietăţile antibiotice şi antidotice ale filtratului.

Scanned with OKEN Scanner

Acțiunea speciei *B. subtilis* și a secrețiilor sale asupra toxinelor bacteriene ar explica, după unii autori, mecanismul imunității naturale întîlnite la unele specii animale față de diverse toxine. Toxinele secretate de germenii respectivi la nivelul tubului digestiv sînt detoxifiate de fermenții bacililor sporulați de tipul lui *B. subtilis* și absorbite sub această formă din stomac, în cazul ierbivorelor, de pe mucoase, în cazul omului și calului, trec în circulația generală, producînd anticorpi.

Continuîndu-se cercetările asupra principiilor antibiotici conținuți de *B. subtilis* s-a putut identifica o serie întreagă de substanțe active ca subtilizina, eumicina, colistatina, subtenolina, bacilomicina, bacilina și bacitracina.

Bacitracina. A fost obținută dintr-o tulpină de *B. subtilis* și are un spectru bacteriostatic larg, cuprinzînd germeni Gram pozitivi și Gram negativi, aerobi și anaerobi. Se poate administra fie per os, cînd, fiind neadsorbabilă prin peretele tubului digestiv, acționează numai asupra florei din tubul digestiv, fie pe căi parenterale. Produsul se titrează, in vitro, pe streptococi hemolitici.

Gramicidina S. Acest antibiotic a fost izolat în U.R.S.S., în 1942, de G a u s e și colaboratorii, din *B. brevis*. Produsul se păstrează timp îndelungat și rezistă la fierbere și sterilizare. Este activ în infecțiile streptococice, pneumococice, dizenterice, tifice, paratifice etc.

El a fost folosit cu bune rezultate în tratamentul tricofițiilor umane.

Polimixina și aerosporina. Două substanțe identice extrase din două specii bacteriene diferite: *Bacillus polymyxa* și *B. ascoporus*. Antibioticele sînt active numai pe cale parenterală și au un grad însemnat de toxicitate. Sînt active față de germenii Gram negativi, cum sînt cei din genurile *Pasteurellla, Salmonella, Escherichia, Haemophilus*. In medicina umană, ele au dat unele rezultate în tratamentul tusei convulsive.

ANTIBIOTICE EXTRASE DIN CIUPERCI (MUCEGAIURI)

Penicilina. F l e m i n g (1929) a observat că pe suprafața de pe agarul unei plăci Petri, însămînțată cu stafilococi, s-a dezvoltat, pe lîngă germenii însămînțați, o colonie de mucegai și că, în jurul acesteia din urmă, coloniile de stafilococ devin transparente, germenii suferind procese litice. Descoperitorul lizosimei a sezisat importanța fenomenului observat și l-a cercetat îndeaproape. El a stabilit, în cursul acestor cercetări, că ciuperca, cultivată întîmplător pe placa cu stafilococi, aparținea speciei *Penicillium notatum* și că ea secretă, chiar cînd este cultivată singură, un principiu litic care topește stafilococii. Filtratul unei culturi de *Penicillium,* veche de 7—8 zile, este, într-adevăr, litic pentru stafilococi în diluție de 1/6 000 — 1/8 000 și în concentrații mai mari și pentru alți germeni, cum sînt *Diplococcus pneumoniae, Bacillus anthracis, B. diphteriae* etc. Principiul litic a fost numit „penicilină" și a fost inițial folosit în laborator pentru izolarea unor specii bacteriene penicilinorezistente. Astfel, pe plăci, îmbibate cu filtrat penicilinic, se putea izola, din cavitatea bucală de la om, *Haemophilus influenzae,* care se dezvoltă în prezența penicilinei.

In afară de *Penicillium notatum,* s-au mai găsit și alte specii din genul *Penicillium* care secretă principii antibiotici. Astfel, E r m o l i e v a și colaboratorii izolează, în 1942, specia *P. crustosum* care secretă un prin-

Fig. 59 — Placa Petri în care Fleming a observat acțiunea antagonistă a speciei *Penicillium notatum* față de stafilococi

cipiu numit de autori penicilina crustosin care este activ față de speciile Gram pozitive, iar, în doze mari, și pentru unele specii Gram negative. De asemenea Greceanu și Gheron-dache (1950), la noi în țară, au izolat specia *P. crysogenum* din care au obținut crisomicină.

Introducerea penicilinei în terapeutica bolilor infecțioase este urmarea unei serii de cercetări care au dus la izolarea și purificarea principiului activ conținut, în special, de filtratul culturilor de *P. notatum*.

Principii generale de preparare a penicilinei. Se folosesc, pentru prepararea penicilinei, tulpini care secretă cantități cît de mari de principiu activ. Cultivarea se face în medii sintetice sau naturale; prepararea și compoziția lor variază, în amănunt, de la o fabrică la alta. Mediul, în vederea cultivării ciupercii, se repartizează în vase care conțin cantități mari de lichid, 70 000—80 000 l. În cazul cînd un curent de aer traversează continuu masa lichidului, ciuperca se dezvoltă și în profunzimea mediului de cultură, iar în caz contrariu, ea se multiplică numai la suprafață.

Sporii, în aceste diverse medii, sînt însămînțați în condiții stricte de asepsie; recipientele infectate se elimină, deoarece germenii de invazie pot neutraliza, prin secrețiile lor, penicilina. Cultivarea se face la temperatura de 22—24°C. Miceliile se dezvoltă după condițiile de aerație, în profunzimea lichidului sau la suprafață și aici constituie o membrană; aceasta, la 7 zile după însămînțare, prezintă o suprafață neregulată și o culoare albastră-verzuie care se datorește sporilor constituiți; picături galbene de lichid se pot observa între faldurile membranei. pH-ul mediului suferă modificări în cursul

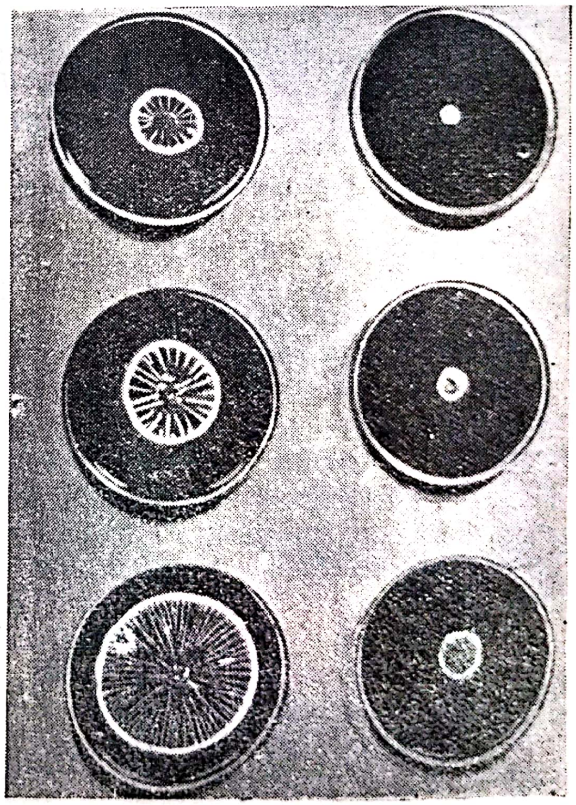


Fig. 60 — Colonii de *Penicillium notatum* de 2; 4; 6; 8; 10 și 12 zile.
Centrul coloniilor este verde, marginile albe constituite din spori

dezvoltării ciupercii : inițial se produce o acidifiere și către a șaptea zi o alcalinizare. Producția optimă de penicilină are loc la pH=7.

Penicilina se extrage din mediul de cultură, după ce miceliile au fost separate, prin filtrare ; principiul activ precipită din soluțiile apoase prin acidifiere cu acid fosforic la pH = 2 ; el se dizolvă în apă la pH = 6,7. Operațiile de dizolvare și precipitare se repetă de mai multe ori. Purificările ultime se fac prin metode cromatografice. Produsul final, sarea de sodiu sau de calciu a acidului penicilinic, se prezintă ca o pulbere albă sau galbenă-portocalie, higroscopică și solubilă în apă. Sarea de calciu este mai puțin higroscopică ca cea de sodiu, dar este mai toxică.

Proprietăți fizico-chimice. Penicilina este un acid instabil, avînd următoarea formulă brută : $C_9H_{11}O_4N_2$ S — R. Sub forma de sare alcalino-teroasă (sare de Ba, Ca sau Na), la pH = 5 sau la pH = 7, ea devine stabilă, păstrîndu-și în același timp proprietatea de a fi solubilă în apă. Penicilina este distrusă de acizi, alcali și căldură. Ea este inactivată de multe substanțe oxidante, de alcali, precum și de enzimele unor specii bacteriene cum sînt *Escherichia coli, Proteus vulgaris* etc.

Proprietăți biologice. Penicilina este foarte puțin toxică pentru țesuturile animale. Sarea de sodiu, injectată intravenos, la șoarece, în doză de 20 mg, nu produce tulburări vizibile. Sarea de calciu este mai nocivă și, în doză de 10 mg, produce tulburări nete la șoarece, iar în doză de 20 mg, modificări tisulare la locul de injecție. Leucocitele nu sînt influențate de prezența penicilinei chiar cînd ea se găsește în concentrații care depășesc cu mult necesitățile terapeutice. Diluțiile de 1/100 nu sînt tolerate de leucocite, dar cele de 1/500 nu produc modificări în fiziologia acestor celule. Acțiunea asupra leucocitelor și toxicitatea generală asupra organismului sînt în funcție de puritatea produsului ; cu cît produsul este mai pur, cu atît el este mai puțin toxic.

Activitatea antibacteriană in vitro. Stafilococii sînt germenii cei mai sensibili față de acțiunea penicilinei și de aceea ei servesc pentru a aprecia valoarea antibiotică a produsului secretat de *Penicillium notatum.* Fiindcă sensibilitatea tulpinilor față de antibiotic variază foarte mult, se folosește, pentru titrarea penicilinei, o tulpină standard (tulpina Oxford). Diluțiile care inhibă dezvoltarea acestei tulpini sînt foarte mari. Astfel, diluțiile în mediu de cultură de 1/14 000 000 — 1/30 000 000 g de penicilină produc o inhibiție totală, iar cele de 1/160 000 000 g o inhibiție parțială. Valoarea antibiotică a penicilinei se exprimă, de obicei, în unități internaționale sau Oxford (U.I. sau U.O.). O soluție de penicilină conține o unitate pe 1 ml cînd în doza de 0,01 — 0,02 ml. inhibă dezvoltarea tulpinilor standard de stafilococ. 1 mg de substanță conține 50 — 1 000 unități ; 1 mg de substanță chimic pură ar conține 2 000 unități. Există deci diferențe între produsul chimic pur și cel industrial, diferență care se exprimă prin numărul de unități conținut pe unitatea de greutate, de produsul industrial în raport cu cel chimic pur. Cu cît un preparat se apropie mai mult de 2 000 unități pe 1 mg, cu atît el este mai pur.

Alături de stafilococi sînt și alte specii sensibile față de penicilină. În ordinea sensibilității descrescînde, speciile bacteriene se clasează astfel : stafilococul, streptococul piogen, streptococul viridans, streptococul nehemolitic, pneumococul, gonococul, meningococul, micrococul cataral, bacilul difteriei, bacilul cărbunelui, speciile patogene de actinomicete, vibrionul septic, *Bacillus perfringens, B. oedematiens.* Speciile din genurile *Bru-*

cella, Salmonella, Escherichia, Shigella, precum şi vibrionul holerei, pneumobacilul lui Friedländer, bacilul piocianic, bacilul proteus, bacilii hemofilici, *Pasteurella animalium, Past. tularensis, Past. pestis,* bacilul tuberculozei, ciupercile şi levurile sînt insensibile sau puţin sensibile.

Germenii penicilinosensibili nu se dezvoltă în soluţiile care conţin acest principiu în doze suficiente. Se constată, în această privinţă, că activitatea bacteriostatică optimă se exercită în anumite concentraţii şi că depăşirea acestei concentraţii, într-un sens sau altul, atrage după sine o reducere a activităţii antibiotice. Concentraţia inhibitoare variază în raport cu sensibilitatea speciei: cu cît sensibilitatea este mai mare, cu atît concentraţia inhibitoare este mai mică şi invers. Anumite substanţe din mediu pot reduce sensibilitatea germenilor. Astfel, Zablocki şi Rolicka (1955) observă că antigenul glucido-lipidopolipeptidic, adăugat în mediu, reduce sensibilitatea stafilococilor faţă de penicilină.

Cantitatea de germeni sensibili, însămînţaţi într-o diluţie de penicilină, nu influenţează, în mod apreciabil, procesul inhibitor, spre deosebire deci de sulfamide care nu sînt bacteriostatice, decît în cazul cînd numărul de germeni însămînţaţi este redus. Mai mult încă, penicilina, spre deosebire de sulfamide, poate liza culturi deja dezvoltate. Adăugînd o cantitate convenabilă de penicilină unei culturi în bulion de *Staphylococcus pyogenes,* incubată 3—4 ore la 37°C şi a cărei turbiditate este manifestă, se obţine, într-adevăr, în cîteva ore, o limpezire a mediului. Acelaşi fenomen se petrece şi în cazul bacilului cărbunelui, streptococilor, pasteurelelor sau altor specii. Culturile în bulion de *Pasteurella animalium,* incubate timp de cîteva ore, sînt lizate numai de concentraţii însemnate de penicilină — 1 000 unităţi pentru 10 ml de bulion. Transplantările din asemenea culturi lizate prin penicilină sînt negative. Germenii au fost deci distruşi. Distrugerea bacteriilor este în toate cazurile precedată de însemnate modificări de ordin morfologic. Celulele bacteriene îşi măresc foarte mult dimensiunile; formele bacilare ale speciei *Bacillus anthracis,* de exemplu, datorită acestui fapt, devin mari, rotunde şi globuloase. (N. Varachiu). Pneumococii suferă un proces similar (Fischer). Creşterea dimensiunilor celulare este, după unii autori, de natură fiziologică şi se datoreşte împiedicării diviziunii celulare: celula asimilează, dar nu se poate diviza.

Penicilina produce, asupra unor germeni pe care îi inhibă, tulburări în ceea ce priveşte metabolismul acizilor nucleici şi al sintezei aminoacizilor. Se constată, în acest sens, că variantele de stafilococi devenite penicilinorezistente prin contact cu antibioticul nu mai folosesc aminoacizii solubilizaţi în mediu, ci îi sintetizează din substanţe hidrocarbonate şi săruri minerale care conţin azot. La fel, s-a mai constatat că variantele de *Salmonella typhi murium,* care au pierdut capacitatea de a sintetiza cisteina, devin sensibile faţă de penicilină. Aceste date arată că penicilina intervine şi inhibă o fază oarecare în procesul de asimilare a aminoacizilor liberi din mediu. Activitatea bacteriostatică se datoreşte deci unui proces de interferenţă, de includere a antibioticului în lanţul proceselor de sinteză şi de blocare a acestor sinteze.

Acţiunea antibacteriană in vivo. Bacteriile sensibile faţă de penicilină, in vitro, sînt, în linii generale, în aceeaşi măsură, sensibile şi în vivo. În consecinţă, infecţiile produse de stafilococi, streptococi, pneumococi, gonococi, meningococi, anaerobii gangrenelor gazoase, *Bacillus anthracis,* bacilul rujetului sînt justiţiabile de un tratament penicilinic. În infecţiile

sifilitice şi actinomicetice, rezultatele sînt dubioase. În difteria umană, penicilina trebuie asociată cu antitoxina, deoarece antibioticul distruge germenul, dar nu toxina sa. Penicilina este ineficace în infecţiile produse de bacteriile Gram negative, cum sînt febra tifoidă, diverse salmoneloze umane sau animale, colibaciloza, bruceloza, pesta bubonică, tularemia, diverse pasteureloze animale etc. Procese morbide provocate de *Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa,* bacilul tuberculozei etc. nu sînt influenţate, de asemenea, de penicilină. La fel, este inactivă în bolile parazitare şi în cele produse de virusuri.

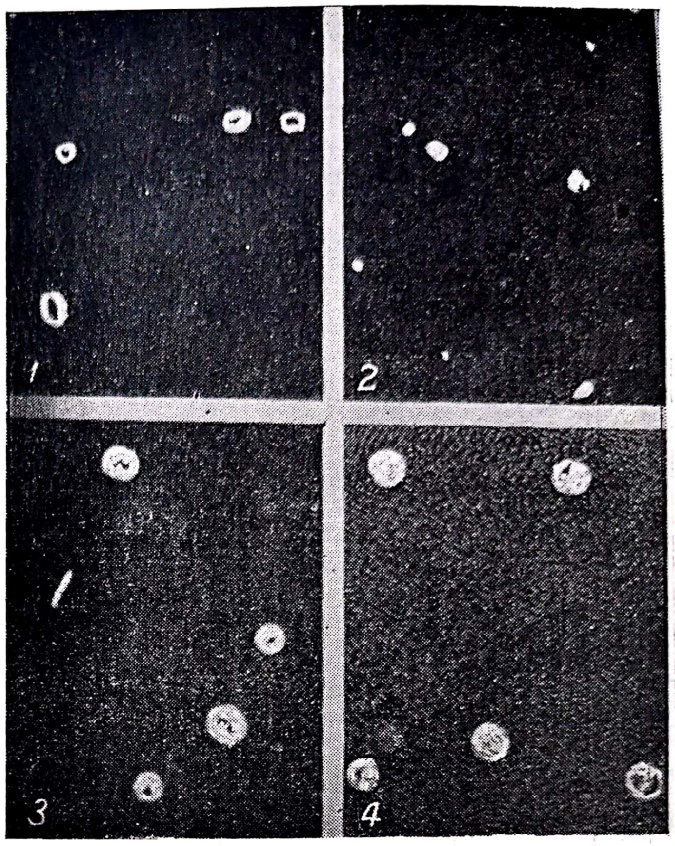


Fig. 61 — Acţiunea penicilinei asupra pneumococului in vivo (după **Fischer**).

1 — pneumococi în cavitatea peritoneală de la şoarece după 90 de minute de la inoculare; 2 — pneumococi în cavitatea peritoneală la şoarece tratat cu penicilină după 90 de minute de la injecţie; 3 — pneumococi în cavitatea peritoneală la şoarece, tratat cu penicilină, după 4 ore de la injecţie; 4 — pneumococi în cavitatea peritoneală de la şoarece, tratat cu penicilină, după 4 ore de la infecţie

Activitatea penicilinei, in vivo, este condiţionată, într-o oarecare măsură, de reactivitatea organismului, de capacitatea sa de reacţie. G a u s e (1950) constată, în această privinţă, că şobolanii normali infectaţi cu pneumococi se sterilizează mult mai repede prin penicilinoterapie decît cei care înainte de infecţie au fost ţinuţi la un regim fără albumine.

Penicilina se administrează pe cale parenterală; calea bucală nu poate fi folosită, deoarece cea mai mare parte din produsul activ este distrus în tubul digestiv.

Injecţiile cu penicilină se pot face intravenos, intramuscular, intrarahidian. Penicilina poate fi injectată în colecţii purulente — abcese, empieme etc. — deoarece, spre deosebire de sulfamide, ea nu este inactivată de conţinutul acestor colecţii. Ea poate fi aplicată, sub formă de comprese, pe regiunile infectate. Injectată, pe cale intravenoasă, ea nu trece decît în proporţii reduse în lichidul cerebrospinal şi în cavităţile seroase şi de aceea este necesar, în cazul cînd infecţia se dezvoltă în asemenea cavităţi, ca injecţia să se facă în cavitatea infectată.

Penicilina se elimină din organism prin rinichi şi o găsim în urină în concentraţii inhibitoare pentru bacterii. Eliminarea se face repede şi de aceea, în tratamentul infecţiilor, produsul trebuie inoculat în repetate rînduri, la 3—4 ore interval. În aceste condiţii ea se menţine în organism

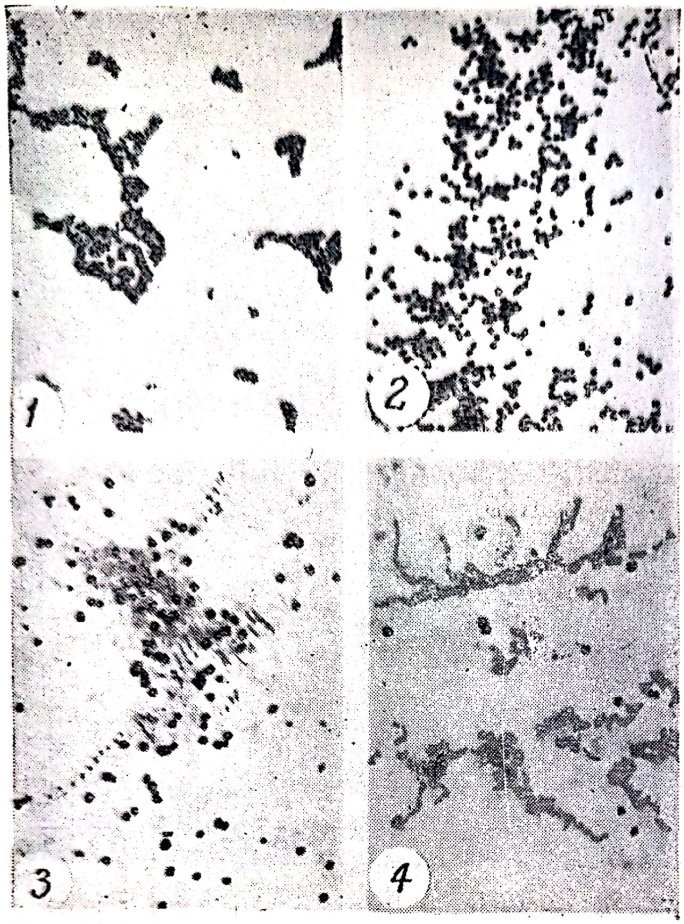


Fig. 62 — Acțiunea penicilinei asupra stafilococilor (după **Fischer**)

1 — cultură normală; 2 — cultură după 3 ore de contact cu penicilină; cocii sînt evidenți și mai intens colorați; 3 — cultură după $7^1/_2$ ore de contact cu penicilină; cocii sînt foarte mari, se observă și resturi celulare; 4 — cultură după 10 ore de contact cu penicilină: cîțiva coci mari și resturi celulare

într-o concentrație suficient de activă. În cazurile grave, pentru a menține o concentrație suficientă și constantă se aplică injecția intravenoasă continuă.

Tratamentul penicilinic trebuie făcut de la început cu doze active, pentru a evita crearea variantelor penicilinorezistente, care iau naștere, adeseori, prin contact cu antibioticul. Astfel, s-a stabilit experimental că stafilococii cultivați și adaptați mediilor cu penicilină au, față de medicament, o rezistență de 1 000 de ori mai mare ca înainte de adaptare. Tulpini de stafilococi, rezistente la penicilină, se pot izola din mediile naturale, fără ca totdeauna această rezistență să poată fi considerată rezultatul unui contact cu antibioticul. De altfel, tulpinile sensibile nu se transformă printr-un simplu contact în tulpini rezistente și, în general, pentru a obține o asemenea transformare este necesar un contact prelungit al germenelui sensibil cu antibioticul, contact întreținut în cursul a numeroase treceri, 20—50.

Doza de penicilină administrată unui bolnav, precum și durata tratamentului variază de la un caz la altul. În infecțiile acute ale omului se injectează 100 000 — 600 000 U.I. zilnic, iar tratamentul durează pînă la dispariția completă a oricărui simptom. Uretrita gonococică a omului se vindecă, de regulă, prin una sau cîteva administrări de penicilină — 300 000 U.I. Rujetul porcului, la fel, se vindecă prin una sau două injecții de penicilină (200 000 — 300 000 U.I.). În endocardita lentă, de natură streptococică, tratamentul durează cel puțin 3 săptămîni. La fel, sifilisul uman necesită un dozaj mare: 3 000 000 — 6 000 000 U.I., care se administrează timp de 8—15 zile.

În general, doza activă se socotește pe kilocorp în 24 de ore și această doză este de 5 000 U.I. pentru om, 10 000 pentru cîine, 2 000 — 10 000 pentru cal etc.

Tratamentul infecțiilor care necesită doze mari de antibiotice, cum sînt sifilisul, endocardita lentă etc., este greu de făcut cu penicilina solubilă din cauza numeroaselor intervenții — injecții din 3 în 3 ore. Pentru a evita acest însemnat inconvenient s-au fabricat produse de penicilină

cu întîrziere, adică preparate care se solubilizează greu şi care pot menţine un timp mai îndelungat concentraţia utilă de antibiotic în umorile organismului. Substanţa insolubilizantă folosită este uleiul. Penicilina cristalizată se înglobează în ulei, în general, în proporţie de 300 000 U.I. pentru 1 ml. Injecţiile cu penicilină uleioasă se fac pe cale intramusculară şi principiul activ se solubilizează treptat, asigurîndu-se astfel o concentraţie suficientă de antibiotic, pentru cel puţin 24 de ore. Injecţiile, în tratamentele prelungite, se fac cu penicilină în ulei, din 24 în 24 de ore.

Penicilina este bine suportată de majoritatea organismelor umane sau animale. Unele semne de intoleranţă se pot observa, totuşi, la oameni şi ele constau din febră, urticarie, crampe musculare, eozinofilie etc., şi ele par a fi mai curînd datorite impurităţilor conţinute de produs decît produsului însuşi. Aceste tulburări sînt de natură alergică şi se combat prin preparate antialergice ca epinefrina şi antihistaminicele. Sensibilizarea este unul din marile inconveniente ale penicilinei în terapia umană.

Tratamentul penicilinic se întrebuinţează pe scară largă în infecţiile bacteriene ale animalelor. Se obţin, astfel, bune rezultate în tratamentul mastitei streptococice a vacilor. Tratamentul constă din infuzii cu soluţii de penicilină, prin canalul galactofor, în sferturile infectate. În fiecare sfert se introduc 50 000 U.I. în 200 ml de apă fiziologică. Tratamentul se repetă, la 12 ore interval, de 2—6 ori (de 6 ori în cazurile cronice şi 2—4 ori în cele acute). Streptococul, în urma unui asemenea tratament, dispare din mamelă.

Penicilina se recomandă, de asemenea, în tratamentul pneumoniei viţeilor; cantitatea necesară este însă foarte mare, 700 000 — 800 000 U.I. zilnic şi durata tratamentului lungă, 8—10 zile. În mamita stafilococică a oilor, penicilina, administrată în doză de 20 000 — 30 000 U.I., asigură vindecarea în cazurile incipiente. Doza indicată se amestecă cu 40 — 50 ml de apă fiziologică şi se injectează în glanda mamară prin canalul galactofor. În antrax, la bovidee şi cabaline, se obţin bune rezultate. Mai mult încă, antraxul la oaie nu poate fi tratat cu ser imun, dar cedează la tratamentul penicilinic. Rezultate bune s-au obţinut în gurma calului, precum şi în infecţiile produse de *Shigella equirulis* la mînji.

Penicilina influenţează favorabil evoluţia jigodiei la cîini, prin aceea că împiedică dezvoltarea infecţiilor secundare.

Penicilina nu dă rezultate apreciabile în pasteurelozele şi colibacilozele animale.

ANTIBIOTICE EXTRASE DIN ACTINOMICETE

Streptomicina. În urma rezultatelor obţinute în terapeutica bolilor infecţioase, cu penicilina, W a k s m a n şi colaboratorii (1944) au întreprins cercetări în vederea descoperirii unui antibiotic care să completeze activitatea penicilinei şi în special, să fie activ faţă de bacilul tuberculozei şi bacteriile Gram negative. Examinînd secreţiile diverselor specii de actinomicete[1], le-au atras atenţia următoarele: *Actinomyces lavendulae* şi *Act. griseus*. Aceasta din urmă secretă o substanţă cu activitatea anti-

[1] Autorii au cercetat 20 000 de culturi izolate din 6 000 de probe de sol provenind din diverse regiuni ale globului.

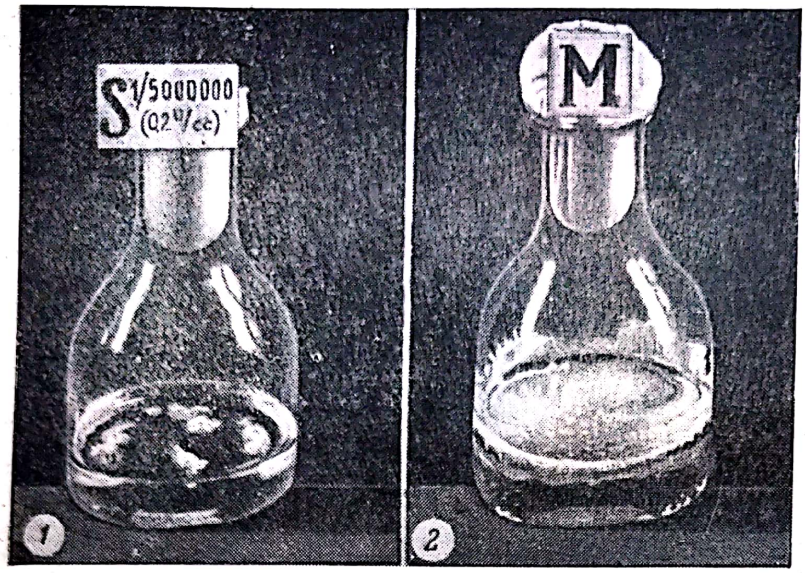


Fig. 63 — Acţiunea bacteriostatică a streptomicinei faţă de *Bacillus tuberculosis* (după **Oeriu**)
1 — bulion cu streptomicină; 2 — bulion martor

biotică însemnată faţă de bacilul tuberculozei şi faţă de unele specii Gram negative sau pozitive şi a fost numită streptomicină.

Act. griseus este un germen sporulat, care se găseşte în pămînt. În vederea obţinerii principiului activ, el se cultivă într-un mediu lichid. Un asemenea mediu şi care a dat bune rezultate este următorul: glucoză 10 g; peptonă 5 g; extract de carne 5 g; clorură de sodiu 5 g; apă 1 000 ml; pH = 6,5 — 7,6. Principiul activ atinge concentraţia maximă după o incubaţie de 7 zile.

Streptomicina se obţine din lichidul de cultivare a actinomicetului, prin purificări succesive care se bazează pe solubilitatea substanţei active în apă şi insolubilitatea ei în alcool, eter sau cloroform. Produsul purificat este o bază organică cristalizabilă şi se prezintă ca o pulbere albă sau gălbuie, solubilă în apă, dar insolubilă în solvenţi organici. Sub formă de pulbere, ea se conservă la rece sau la temperatura camerei pînă la 18 luni; în soluţii sterile se păstrează cel mult 1 săptămînă, şi se recomandă, din această cauză, ca o dată soluţiile făcute să fie în timp cît mai scurt injectate. Prin încălzire la 100°C, ea nu pierde decît 50% din activitatea sa. Este inactivată de acizi şi inhibată de glucoză. Activitatea sa antibiotică este maximă la pH = 8.

Streptomicina este practic lipsită de nocivitate; şoarecele suportă, fără nici un inconvenient, doze de 1 000 de ori mai mari decît cele terapeutice. Doza toxică şi mortală este de 1—5 g pe 1 kg de greutate vie şoarece. Cobaiul suportă antibioticul în cantităţi însemnate şi timp îndelungat. Omul tolerează, în general, bine acest produs. Totuşi, dozele mai mari de 4 g zilnic şi administrate lung timp pot produce tulburări vestibulare, vertigii, surditate, urticarii, migrene, exanteme etc.

In vitro, streptomicina este inhibitoare pentru bacilii acidorezistenţi, în special *Mycobacterium tuberculosis*, ca şi pentru *Bacillus subtilis, B. mycoides, B. pyocyaneus, Proteus vulgaris, Escherichia coli, Pasteurella animalium, Past. punctata, Past. pestis, Past. tularensis,* speciile din genul *Salmonella, Brucella, Hemophilus, Staphylococcus, Listerella* etc.

Ea este inactivă sau puţin activă faţă de *Bacillus anthracis,* bacilul rujetului, anaerobii sporulaţi, virusurile filtrabile, paraziţii animali etc.

Mecanismul acţiunii antibiotice a streptomicinei a fost studiat de numeroşi cercetători. E. Soru şi colaboratorii (1950—1951) constată, în

această privință, că streptomicina are acțiune inhibitoare asupra activității unor fermenți bacterieni cum sînt catalaza, ureaza, dehidraza și tripofanaza. În prezența streptomicinei, culturile de *Proteus vulgaris* nu mai produc, de exemplu, indol, din cauză că triptofanaza este inhibată și ea nu mai poate transforma triptofanul în indol, acid piruvic și amoniac. Aceste cercetări ca și altele arată că streptomicina blochează unele sisteme enzimatice ale bacteriilor și prin aceasta le oprește multiplicarea.

Streptomicina în scopuri terapeutice se administrează pe cale parenterală, în special intramusculară; calea intravenoasă nu este recomandată, ea putînd da naștere la accidente.

Administrată parenteral se răspîndește în organism prin sînge, se elimină prin urină, și se pare că și prin bilă. Streptomicina nu traversează peretele tubului digestiv și administrată per os ea nu trece în sînge decît în proporții infime — 2%. Antibioticul nu este însă inactivat în acest traiect, astfel că, prin acțiunea sa, el modifică flora intestinală, reducînd, în special, numărul colibacililor. Colibacilii rămași devin însă prin acest contact rezistenți față de substanța activă.

Activitate in vivo. Streptomicina protejează șoarecele față de infecție cu diverse salmonele, bacilul piocianic, pneumococ, stafilococ, pasteurele etc. Embrionii de pui pot fi protejați prin streptomicină față de infecții mortale făcute cu *Salmonella pullorum* sau cu *Brucella.* La om s-au obținut unele rezultate în tularemie, febră tifoidă, bruceloză, pneumonii produse de *Klebsiella pneumoniae* etc. În infecțiile colibacilare, streptomicina dă rezultate bune; administrînd bolnavului cîte 1 g de streptomicină pe zi, în opt reprize, se poate obține o sterilizare a aparatului urinar. Antibioticul secretat de *Actinomyces griseus* a dat rezultate bune în infecțiile tuberculoase experimentale, ca și în infecția bacilară a omului și aceste rezultate îi conferă cea mai mare importanță. S-a arătat, în această privință, că, la cobai, streptomicina previne infecția tuberculoasă și poate chiar produce vindecarea leziunilor constituite. Mortalitatea printre cobaii tratați cu cîte 1,5 mg zilnic, începînd cu a 42-a zi de la infecție, a fost de 8%, iar printre martorii infectați, în aceleași condiții, dar netratați, ea a fost de 70%. Cobaii care n-au murit pînă în a 162-a zi de la infecție au fost sacrificați; martorii prezentau, după acest interval de timp, leziuni întinse, în timp ce la cobaii tratați leziunile erau absente sau foarte limitate; unii din acești din urmă cobai nu mai reacționau în timpul vieții nici la tuberculină, iar după sacrificare nu s-au putut izola din organele lor bacili virulenți.

În granulia tuberculoasă umană, streptomicina produce cel puțin ameliorarea bolii. Tratamentul durează 90 — 180 de zile, doza zilnică fiind de 1—2 g. Bolnavii suportă bine această medicație prelungită. Deși leziunile, clinic și radiologic, dispar în urma acestui tratament, vindecarea nu este totdeauna totală și recidivele sînt frecvente.

Meningita tuberculoasă poate beneficia de un tratament streptomicinic. Rezultatele obținute însă de unii clinicieni arată că valoarea streptomicinei în tratamentul meningitei tuberculoase la copii, este redusă; în unele cazuri ea este complet ineficace, în altele, bolnavul deși se vindecă rămîne un ratat și, în fine, în a treia categorie de cazuri, după o aparentă vindecare, infecția reapare; ea este produsă acum de germeni streptomicinorezistenți și are o evoluție fatală. Literatura medicală dă însă și cazuri în care s-au obținut rezultate bune.

Scanned with OKEN Scanner

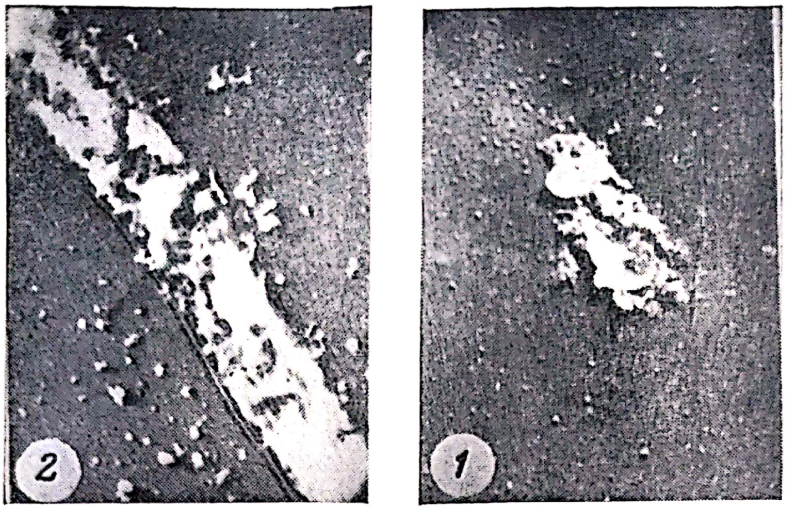


Fig. 64 — Acțiunea aureomicinei asupra celulelor speciei *Salmonella typhi murium* (după **Scanga**)
2 — se observă o granulare a citoplasmei; 1 — liza celulei este aproape completă (x 18 000)

Streptomicina, în cazuri de meningită, se injectează suboccipital, în lichidul cefalorahidian, administrîndu-se zilnic 100—200 mg, iar intramuscular, tot zilnic, 1,2 pînă la 3,6 g. Durata tratamentului este de 3—6 luni.

Bacilii tuberculozei devin, în cursul tratamentului, rezistenți față de antibiotic. Astfel, după unele cercetări, un bacil care înainte de tratament era inhibat de 0,15 U. I. pe 1 ml, 2 săptămîni după tratament el nu mai era inhibat de 0,15 U. I. pe 1 ml ci de 1 000 U. I. de streptomicină pe 1 ml. Streptomicinorezistența se instalează însă de regulă după un tratament destul de îndelungat (6—7 luni), în care timp masa principală a germenilor a fost distrusă, iar formele rezistente rămase sînt inhibate de mijloacele de apărare ale organismului. Aceste forme nu prezintă un prea mare pericol pentru omul tratat cît pentru cei pe care acest om i-ar infecta, transmițîndu-le un germen rezistent față de steptomicină.

Capacitatea antibiotică a streptomicinei se accentuează prin asocierea ei cu alte substanțe. Oeriu constată, în acest sens, că produsul I_2, constituit din streptomicină plus sulfosalicilat alithiocinat este în comparație cu streptomicina singură mult mai activ față de bacilul tuberculozei atît in vivo cît și in vitro. In vitro, produsul I_2 este bacteriostatic în diluție de 1/9 800 000, iar streptomicina singură în diluție de 1/3 000 000. In vivo, pe cobai, produsul I_2, în comparație cu streptomicina, este mai puțin toxic și mai activ.

In meningita tuberculoasă experimentală a ciinelui, Oeriu și colaboratorii (1952) au arătat, la fel, că produsul I_2 vindecă 89—100% din cazuri, în timp ce streptomicina singură nu reușește decît să prelungească cu 19 zile durata infecției. Un alt avantaj pe care îl prezintă produsul I_2 este acela că bacilii nu devin rezistenți față de acest compus.

Produsul I_2 a fost cercetat de Oeriu și Munțiu și cu privire la activitatea sa față de bacilul morvei, constatîndu-se că el este de 10 ori mai activ decît streptomicina singură.

Streptomicina a fost asociată în tratamentul tuberculozei și cu alte produse medicamentoase. Astfel, Stribut (1952) a asociat streptomicina cu P.A.S. (acidul paraminosalicilic) obținînd bune rezultate în pregătirea bolnavilor cu leziuni pulmonare grave în vederea unor operații chirurgicale. Preparatul se administrează per os, zilnic, în doza de 0,2 g pe kilocorp, doza pentru o serie de tratament putînd fi de 300—500 g.

Scanned with OKEN Scanner

Aureomicina. Aureomicina sau duomicina se extrage dintr-un streptomicet *(Streptomyces aureofaciens)*. Antibioticul este foarte puțin toxic și se administrează pe cale bucală, fiind activ față de:

1. streptococi;
2. pneumococi;
3. gonococi;
4. meningococi;
5. *Brucella melitensis, Br. abortus,* și *Br. suis;*
6. virusul limfogranulomatozei inguinale;
7. diversele rickettsii.

Teramicina se extrage tot dintr-un actinomicet și anume din *Streptomyces rimosus*. Este o substanță cristalină, solubilă, mai ales în mediu alcalin. Se conservă în soluție. Spectrul bacteriostatic este asemănător cu al aureomicinei (F i n d l a y și col. 1950).

Viomicina se extrage din *Str. piniceus* și este activă, mai ales, față de bacilul tuberculozei. Se folosește în tratamentul formelor de tuberculoză produse de bacili streptomicinorezistenți.

Neomicina se extrage din *Str. fradiae* și are un spectru bacteriostatic asemănător cu al streptomicinei.

Cloromicetina sau **cloramfenicolul** este un antibiotic obținut, în 1947, tot dintr-un streptomicet *(Str. venezuelae)*. Formula sa chimică este cunoscută și substanța a putut fi obținută pe cale sintetică, sub formă cristalină (C i o r ă n e s c u, 1950).

Este activă, pe cale bucală, în infecțiile produse de stafilococi, brucele, colibacili, salmonele, bacilul lui Friedländer, rickettsii (tifosul exantematic), virusul psittacozei etc.

*

Streptomicina, penicilina ca și celelalte antibiotice nu trebuie considerate ca panacee universale, bune contra tuturor infecțiilor. Ele nu dau rezultate decît în anumite infecții și de aceea, înainte de orice tratament, un diagnostic precis bacteriologic este imperios necesar. El ne arată natura infecției și deci antibioticul la care trebuie să recurgem pentru a o învinge.

Acesta va fi administrat la timp, în doză suficientă și pentru un timp suficient de lung. În aceste condiții rezultatele vor fi bune, în afara lor ele nu pot fi decît întîmplătoare.

ANTIBIOTICELE IN ZOOTEHNIE

Antibioticele sînt folosite astăzi nu numai în tratamentul diverselor infecții la om și animale, dar și ca stimulatori ai creșterii animalelor domestice și chiar ai plantelor. S-a ajuns la această aplicație în urma constatării că animalele, hrănite cu reziduuri de la fabricile de penicilină, se dezvoltă în condiții optime și ritmul de creștere nu este justificat prin rația consumată. S-a cercetat atunci valoarea stimulatoare a diverselor antibiotice pure și s-a constatat că, chiar în aceste condiții, ele exercită, într-adevăr, o acțiune favorabilă asupra creșterii animalelor, în special asupra creșterii porcilor și păsărilor. Productivitatea animalelor tratate cu antibiotice crește; producția de ouă la găini, de exemplu, se mărește simțitor sub influența antibioticului.

Mecanismul acțiunii stimulatoare a antibioticelor nu este încă în totul lămurit. În general, se admite că această acțiune este complexă. Astfel, antibioticele ar produce stimularea dezvoltării atît prin acțiunea lor asupra florei intestinale, cît și prin lichidarea unei stări morbide subclinice care, în absența intervenției antibioticelor, nu produc tulburări manifeste, dar reduc capacitatea de asimilare a organismului animal (Kivman, 1954).

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

ADO A. — Studiul asupra alergiei în etapa actuală, *Arh. Patologhii*, 1951, nr. 3, p. 3.

ADO A. — Antigenii ca excitanţi extraordinari ai sistemului nervos, *Medghiz, Moscova*, 1952.

AKIMOVICI V. V. — Importanţa sistemului nervos în reacţii inflamatorii de natură infecţioasă, toxică şi alergică. Rolul sistemului nervos în reacţiile alergice, în cazul tuberculozei experimentale, *J. mikrobiologhii epidemiologhii iimunologhii*, 1953. nr. 12, p. 28.

ALLOWAY L. — Transformarea, in vitro, a pneumococului R. în forma S a diferitelor tipuri specifice prin folosirea filtratelor de extracte pneumococice, *J. Exp. Med.*, 1932, 55.

ANDREWS H. C. — Acţiunea serului imun asupra vaccinului şi virusului III in vitro *J. Path. a. Bact.*, 1928, 31, p. 671; 1929, 32, p. 265 şi 273; 1930, 33, p. 265 şi 301

ANGHELESCU I. şi col. — Titrarea microbiologică a mertiolatului de sodiu, *Revista de igienă, microbiologie şi epidemiologie*, 1952, nr. 2, pag. 52.

ARTHUS M. — Injecţiile repetate de ser de cal la iepure, *Bull. de la Soc. de Biol.* 1903, p. 817.

ARTHUS M. — De l'anaphylaxie a l'immunité, *Masson Paris*, 1921.

ARTHUS M. şi BRETON M. — Leziuni cutanate produse prin injecţii de ser de cal la iepure anafilactizat prin şi pentru acest ser, *Bull. de la Soc. de Biol.* 1903, p. 1 478.

ATANASIU P. — Acţiunea boratului de fenil mercur asupra virusului variolei aviare, vaccinal, rabic şi pseudopestei aviare, *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, 78, p. 541.

AVERY O. T, MC. LEOD C. M. şi MC. CARTY M. — Transformarea pneumococului tip II în tip III sub acţiunea acidului dezoxiribonucleic, *J. Exp. Med.* 1944, 79, p. 137.

BABEŞ V. şi LEPP — Cercetări asupra vaccinaţiei antirabice, *Ann. Inst. Past.* 1889, 3, p. 384.

BABEŞ V. — Observaţiuni asupra corpusculilor metacromatici, asupra sporilor, ramificaţiilor şi capsulelor bacteriilor patogene, *Romînia medicală*, 1895, 3, p. 417 şi p. 450

BABEŞ V. — Despre descoperirea seroterapiei, *Romînia medicală*, 1894, 2. p. 467

BADENSCHI GH. şi BRUCKNER I. — Contribuţii la studiul virusurilor filtrante, *Arch. Roum. de Path. Expér.*, 1937, 10, p. 341.

BAIL O.— Schimbarea bacteriilor în organismul animal, *Zbl. f. Bakt. O.*, 1915,75 p. 159 şi 76, p. 38 şi p. 330

BAIL O. — Agresinele bacteriene, *Handbuch. Path. microorg.*, 1929, vol. II.

BĂLTEANU I., TOMA A. şi CARAGULI A. — Principiul edematogen şi alergia cărbunoasă *Arch. Roum. de Path. Expér.*, 1943, 13, p. 133.

Scanned with OKEN Scanner

DOBINSKI R. I. — Purtătorii de bacili şi combaterea lor, *Medghiz, Moscova*, 1953.
DOERR R. — Complementul, *Viena*, 1947.
DOERR R. — Anticorpul, *Viena*, 1947.
DOERR R. — Antigenul, *Viena*, 1948.
DOMAGK G. — Contribuţii la chimioterapia infecţiilor bacteriene, *D. Med. Wochenschrift*, 1935, p. 250.
DOMAGK G. şi HEGLER C. — Chemioterapia infecţiilor bacteriene, *Leipzig*, 1942.
DUBOS R. J.— Efectul bactericid al unui extract dintr-un bacil al solului asupra cocilor Gram-pozitivi, *Proc. Soc. Expl. Biol. and. Med.*, 1939, 40, p. 311 — 312.
DUBOS D. J. — Celula bacteriană, *Editura de stat pentru literatura străină, Moscova*, 1948.
DUJARRIC DE LA RIVIÈRE., EYQUEM A. şi MILLT P. — Grupele sanguine ale oilor, *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, p. 576.
EFENDI ZADE şi col. — Contribuţii la problema variabilităţii bacteriilor din grupul coli, *J. mikrobiologhii, epidemiologhii i imunobiologhii*, 1953, nr. 4, p. 42.
EGOROV N. S. — Antagonismul microbian dirijat, *Mikrobiologhia*, 1952, 1, p. 116.
ELPINER E. I. — Undele ultrasonore în microbiologie, *Mikrobiologhia*, 1952, 11.
ENDERLEIN C. — *Bakterien Cyclogenie*, 1925.
ENDERS F. J., WELLER H. T. şi ROBINS C. F. — *Science* 1949, 109, p. 85.
EYQUEM A. şi PODLIACHOUK L. — Grupele sanguine ale equideelor, *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, p. 56 şi 405 şi 1953, 84, p. 966 şi 85, p. 621.
FIEGE H. — Transmiterea anticorpilor de la mamă la fetus şi la animalele nou născute, *Vet. Med. Nachrichten*, 1953, nr. 3-4, p. 205.
FINDLAY C. A. şi col. — Teramicina, un nou antibiotic, *Science*, 1950, 3, p. 85.
FERNBACH A. — Absenţa microbilor în ţesuturile vegetale, *Ann. Inst. Pasteur*, 1888, 2, p. 567.
FLEMING A. — Asupra acţiunii antibacteriene a culturilor de Penicillium, cu referinţe speciale asupra întrebuinţării lor în izolarea B. influenzae, *Brit. J. of. Exp. Path.*, 1929, 10, p. 226.
FLEMING A. şi ALLISON V. D. — Observaţii asupra unei substanţe bacteriolitice (lizosima) prezentă în secreţii şi ţesuturi, *Brit. J. of. Exp. Path.* 1922, 3. p. 252.
FRENKEL M. N. şi KARPENKO C. M. — Studiul respiraţiei la anaerobii obligatorii, *Mikrobiologhicinîi jurnal*, 1953, 15, nr. 2
GAMALEIA N. — Studiu asupra vaccinării cărbunoase, *Ann. Inst. Pasteur*, 1888, 2, p. 517.
GAMALEIA N. — Elemente de Bacteriologie generală, *Berlin*, 1900.
GAMALEIA N. — Factorii imunităţii. *J. mikrobiologhii, epidemiologhii i imunologhii* 1955, nr. 8.
GANUSKIN S. M. — Factorii mediului exterior în epizootologia bolilor contagioase, *Veterinaria*, 1951, 3.
GAUSE F. G. şi BRAHNIKOVA G. M — Gramicidina S origina şi modul de acţiune *Lancet*, 1944, 247, p. 715.
GEORGESCU V., POP A. şi STAMATIN N. — Sulfamidele şi sulfamidoterapia în medicina veterinară, *Bucureşti* 1944.
GEORGESCU V. — Reacţiuni de identificare a sulfamidelor, *Arh. Vet.*, 1945, 37, p. 24.
GEORGESCU V. — Clasificarea sulfamidelor, *Arh. Vet.*, 1945, 37, p. 89.
GEORGESCU V., NICHITA H. şi NICHITA G. — Contribuţii la studiul dozării sulfamidelor, *Rev. ştiinţelor medicale*, 1947, 36, p. 176.
GEORGESCU V. şi LAMBRU-RĂDULESCU F. — O nouă metodă de dozare a sulfamidelor în substanţele biologice, *Analele Institutului de patologie şi igienă animală*, 1950, 2, p. 128,
GEORGESCU V. şi BOGDAN EL. — Contribuţii experimentale la studiul constantelor hidroxidului de aluminiu ca adsorbant de virusuri, *Analele Institutului de patologie şi igienă animală*, 1950, 2, p. 128.
GEORGESCU V., ŢAGA L. şi ŢAGA M. — Adsorbţia proteinelor serice pe hidroxid de aluminiu, *Analele Institutului de patologie şi igienă animală*, 1955,5, p. 191.
GEY O. G. şi AMER J. — Cancer, 1933, 17, p. 752.
GEY O. G. GEY V. M., şi AMER J. — Cancer, 1936, 27, 45.

Scanned with OKEN Scanner

SUHOV S. C. — Geneza speciilor la virusuri, *Izvestia Academii Nauk. S.S.S.R., seria biologică* 1953, 3, p. 3.
SURDAN C., SUHACI I. şi ŢAGA M. — Studii asupra clasificării tulpinilor de pestă aviară, *Lucrările Sesiunii generale ştiinţifice 2—22 iunie 1950 a Acad. R.P.R.*
ŢAGA M., GEORGESCU V., ŢAGA L. şi CÎRSTEŢ I. — Un nou procedeu de preparare a serului deproteinizat, necesar culturilor de ţesuturi in vitro, *Analele Institutului de patologie şi igienă animală*, 1955, 5, p. 199.
TCHAN Y. T. şi GIUNTINI — Studiul citologic al bacteriilor în microscopia electronică, *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, 77, p. 188 şi 313.
TERENTIEV F. şi STEFANOVA E. — Despre rolul sistemului nervos în imunogeneza bolilor infecţioase, *Docladî A.S.H.N. Lenin*, 1950, 8, p. 40.
TERENTIEV F. — Cu privire la rolul sistemului nervos în imunogeneza şi la noul principiu de vaccinare cu cultură microbiană inactivată, *Trudî vsesoiuznogo instituta experimentalnoi veterinarii*, vol. XIX, ediţia a II-a 1952.
TISELIUS A. — Bioch. J. 1937, 31, II p. 1 464; 1937, 31, I, p. 313 şi *J. Exp. Med.* 1937, 65, p. 641.
TIHONENKO — Fenomenele bacteriofagiei la actinomicete, *Priroda*, 1950, nr. 3
TOPLEY W. E. C. şi WILSON S. G. — Principii de bacteriologie şi imunitate, *Londra*, 1946.
TOVARNIŢCHI I. V.— Chimia şi biochimia virusurilor filtrante, *Studii şi cercetări de inframicrobiologie, microbiologie şi parazitologie*, 1953, 4, nr. 1—2, p. 7.
TREFONEL şi col. — Activitatea p. aminofenilsulfamidei asupra infecţiilor streptococice experimentale ale şoarecelui şi iepureiui, *C. R. Soc. Biol.* 1935, 420. p. 756.
TROIŢKI L. V., PERSINA G. G. şi SOLOVIOV N. N. — Cu privire la mecanismul apariţiei formelor de bacterii rezistente faţă de agenţii chimio-terapeutici, *Studii şi cercetări de inframicrobiologie, microbiologie şi parazitologie*, 1953, 4, nr. 2, p. 145.
TUDORIU C. şi FEŢEANU A. — Cercetări asupra variaţiei titrului complementului conglutinant în serul cailor sănătoşi şi cu diferite stări patologice, *Anuarul Institutului de patologie şi igienă amimală*, 1951—52, 3, p. 58.
TULASNE R. şi col. — Cîteva noi precizii asupra ciclului L. al bacteriilor, *Ann. Inst. Past.* 1953, 85, p. 525.
TURCANU A. — Statistica factorului Rh, în populaţia oraşului Bucureşti, *Rev. ştiinţelor medicale*, 1947, 36, p. 522.
TUREVICI I. E. şi AVAKIAN A. A. — Natura incluziilor intracelulare, *Dokladî Akad. Nauk. S.S.S.R.*, 1950, p. 75.
VEINDRACK G. şi ŞERMAN I. — Din istoria virusologiei, *Mikrobiologhia*, 1952, t. XXI, 4, p. 495.
VIAZAV O. — Introducere la studiul imunologiei embriogenezei, *Uspehi Sovrom. Biol.*, vol. XXXIII, 1952, 1, p. 47.
VIEUCHEANGE J. şi STAMATIN L. — Influenţa mediilor de cultură conţinînd celule embrionare, asupra amestecurilor neutre de virus vaccinal şi antiser, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, p. 904.
VIEUCHANGE J. şi MESROBEANU I. — Influenţa membranei corioalantoidiene a embrionului de găină asupra amestecului virus vaccinal şi antiser, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, p. 951.
VIEUCHEANGE J. — Influenţa căilor de inoculare (în special calea intracerebrală) asupra amestecurilor de virus vaccinal şi ser imun, *C. R. Soc. Biol.* 1938, 128, p. 953.
VIEUCHEANGE J. — Acţiunea extractelor testiculare asupra amestecului virus vaccinal — ser imun, inoculat pe cale intradermică, *C.R. Soc. Biol.*, 1938, 128, p. 901
VLAD A. şi col. — Studii experimentale asupra problemei antigenilor, utilizînd leziunea termică de organ ca antigen şi teste de disproteinemie ca indice de modificare globulinică *Acad.R.P.R. Bul. ştiinţific, Secţia ştiinţe medicale* 1952, 4, nr. 4, p. 875
VLĂDESCU R.—Cunoştinţele actuale asupra imunităţii, *Revista ştiinţelor medicale*, 1948, 37, p. 195.
VLĂDESCU R. — Laptele şi controlul său igienic, *Bucureşti*, 1945
WAKSMAN S. A., BUGIE E. şi SCHATZ A.— Izolarea antibioticelor din microorganismele solului, cu referinţe speciale asupra streptotricinei şi streptomicinei, *Proc. Staff. Meed. Mayo Clin.*, 1944, 19, p. 537.

Scanned with OKEN Scanner

ERATĂ

Pag.:	*Rînd:*	*În loc de:*	*Se va citi:*	*Din vina:*
9	3 de jos	pera	per	Editurii
17	10 de sus	Rotsov	Rostov	"
27	19 de sus	1 η	1 μ	Tipografiei
33	2 de sus	Gameleia	Gamaleia	Editurii
40	2 de jos	Zizoni	Zironi	"
50	9 de jos	10,2'	10,2"	"
51	17 de sus	lulei	celulei	Tipografiei
51	Fig. 10	*Bacillus cochearius*	*Bacillus cochlearius*	Editurii
54	11 de jos	din	doi	"
79	16 de sus	*pastorianum)*	*pasteurianum)*	"
112	Fig. 16	carbon ;	carbonice ;	"
130	6 de sus	malzotă	maltoză	"
142	Tabelul 19	*Azobacter*	*Azotobacter*	"
173	14 de jos	aglutinante	aglutinate	"
179	Fig. 38 —	papilonului	papilomului	"
183	Tabelul 23	Virusul ectromieliei	Virusul ectromeliei	"
199	24 de sus	Cl_3 Mg	Cl_2 Mg	"
218	3 de jos	*neutrotrop*	neurotrop	"
233	17 de sus	endogenă	aerogenă	"
248	21 de sus	Neneki	Nencki	"
252	11 de jos	cistidină	histidină	"
257	22, 23, 24 şi 25 de sus	componenţe	componente	"
258	1 de sus	componenţe	componente	"
298	5 şi 8 de sus	1 ml	1 mm^3	"
299	21 de jos	raticulare	reticulare	"
349	6 de sus	anamnetică	anamnestică	"
349	11 de jos	anamnetice	anamnestice	"
361	27 de sus	precipitogen	precipitinogen	"
393	23 de jos	Priquet,	Pirquet,	"
398	21 şi 22 de jos	Adelsberg	Adlersberg	"
401	19 de jos	umbeliform	umbreliform	"
403	9 de sus	Gildemeistel	Gildemeister	"
409	10 de jos	diseptol	diseptal	"
424	Tabelul 44	intraveninos	intravenos	"
424	Tabelul 44	*Chroobacterium iodinum*	*Chromobacterium iodinum*	"
439	12 de sus	ANDREWS H. C. —	ANDREWES H. C. —	"
440	9 de sus	BARSKIG.,	BARSKI G.,	"
441	5 de sus	formele Sale	formele S ale	Tipografiei
442	18 de sus	CHATLY N.	HEATLEY	Editurii
442	21 de sus	CHAMERLAND	CHAMBERLAND	"
443	1 şi 2 de jos	şi AMER J. — Cancer,	*American Jurnal Cancer*	"
444	24 de sus	HANDLEY PH.	HADLEY PH.	"
444	32 de sus	ALBOTIN G. I.	HALBOTIN G. I.	Tipografiei

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINSUL

Pag.

Prefață 5

Partea I

NOȚIUNI INTRODUCTIVE

Evoluția cunoștințelor noastre despre microbi 9
Microbiologia în Rusia și U.R.S.S. 15
Dezvoltarea microbiologiei în țara noastră 18
Definiția și conținutul microbiologiei 24
Poziția microbilor în sistematica viețuitoarelor 24

Partea a II-a

BACTERIOLOGIE GENERALĂ

Clasa SCHIZOMYCETES Nägeli, *1857* 31
Caractere generale 31
Morfologia bacteriilor 32
Forma bacteriilor 32
Multiplicarea bacteriilor 33
Modul de grupare a celulelor bacteriene 35
Dimensiunile celulelor bacteriene 36
Sporul bacterian 37
Constituenții morfologici ai celulei bacteriene 44
Fiziologia bacteriilor 59
Compoziția chimică a bacteriilor 59
Afinitățile tinctoriale ale bacteriilor 67
Fermenții bacterieni 69
Respirația la bacterii 73
Nutriția bacteriană 77
Biologia bacteriilor 90
Principalele manifestări vitale ale bacteriilor 90
Influența diverșilor factori din mediu asupra bacteriilor 97
Procese de variație la bacterii 114

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

Variantele S şi R 115
Variaţii privind dimensiunile şi forma 119
Variaţii privind alte caractere morfologice decît forma 126
Variaţii privind aspectul cultural 127
Variaţii privind patogenitatea 128
Variaţii privind echipamentul enzimatic 129
Variaţii privind structura antigenică 130
Cauza variaţiilor 132
Rolul coloniilor secundare sau fiice în apariţia variaţiilor 137
Răspîndirea şi rolul bacteriilor în natură 141
Microflora solului 141
Microflora apei 144
Microflora aerului 147
Microflora normală a organismului 149
Microflora nutreţurilor 150
Microflora gunoiului 151
Microflora laptelui 152
Rolul microbilor în transformarea organismelor în natură 153
Importanţa practică a fermenţilor microbieni pentru diferite ramuri industriale 158

Partea a III-a

VIRUSOLOGIE GENERALĂ

Noţiuni introductive 163
Caracterele generale ale virusurilor 165
Nomenclatura virusurilor 166
Importanţa studiului virusurilor 167
Morfologia virusurilor 169
Incluziile celulare 170
Corpusculii elementari 172
Imagini obţinute printr-o altă optică decît cea cu lumină 174
Determinarea dimensiunilor virusurilor 180
Dimensiunile şi forma virusurilor 183
Sarcina electrică a virusurilor 185
Multiplicarea virusurilor 185
Fiziologia virusurilor 187
Compoziţia chimică 187
Metabolismul virusurilor 195
Metode de cultivare a virusurilor 196
Biologia virusurilor 206
Acţiunea diverşilor factori din mediu asupra virusurilor 206
Conservarea virusurilor 212
Proprietăţile biologice generale ale virusurilor 215

Partea a IV-a

INFECŢIA MICROBIANĂ

Generalităţi 233
Caractere generale ale infecţiei 234
Clasificarea infecţiilor 237

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

Identificarea naturii infecţioase a unei stări morbide. Postulatele lui Koch.. 241
Factorii care condiţionează apariţia unei infecţii 242
Germenul patogen 242
Gazda receptivă 261
Poarta de intrare 271
Doza de germeni 273
Originea infecţiilor 279

Partea a V-a

ELEMENTE DE IMUNOLOGIE

Dezvoltarea imunologiei 285
Factori normali de imunitate 290
Factori pasivi de apărare 290
Factori activi de apărare 291
Dobîndirea unor factori de imunitate 306
Clasificarea stărilor de imunitate 307
Crearea stărilor de imunitate dobîndită 312
Crearea stărilor de imunitate dobîndită activă 312
Crearea stărilor de imunitate dobîndită pasivă 316
Antigenul şi anticorpul 327
Antigenul 327
Anticorpul 337
Reacţiile dintre antigen şi anticorp 349
Specificitatea reacţiilor dintre antigen şi anticorp 349
Modificări suferite de antigeni în prezenţa anticorpilor 352
Stările alergice 379
Mecanismul imunităţii dobîndite 398
Paraimunitatea 401
Imunitatea la plante 404
Principii de chimioterapie a infecţiilor bacteriene 406
Sulfamidele şi sulfamidoterapia 406
Antagonismul microbian. Substanţele antibiotice 417
Bibliografie 437

Scanned with OKEN Scanner

ERATĂ

Pag.:	*Rînd:*	*În loc de:*	*Se va citi:*	*Din vina:*
9	3 de jos	pera	per	Editurii
17	10 de sus	Rotsov	Rostov	"
27	19 de sus	1 η	1 μ	Tipografiei
33	2 de sus	Gameleia	Gamaleia	Editurii
40	2 de jos	Zizoni	Zironi	"
50	9 de jos	10,2'	10,2"	"
51	17 de sus	lulei	celulei	Tipografiei
51	Fig. 10	*Bacillus cochearius*	*Bacillus cochlearius*	Editurii
54	11 de jos	din	doi	"
79	16 de sus	*pastorianum)*	*pasteurianum)*	"
112	Fig. 16	carbon ;	carbonice ;	"
130	6 de sus	malzotă	maltoză	"
142	Tabelul 19	*Azobacter*	*Azotobacter*	"
173	14 de jos	aglutinante	aglutinate	"
179	Fig. 38 —	papilonului	papilomului	"
183	Tabelul 23	Virusul ectromieliei	Virusul ectromeliei	"
199	24 de sus	Cl_3 Mg	Cl_2 Mg	"
218	3 de jos	*neutrotrop*	neurotrop	"
233	17 de sus	endogenă	aerogenă	"
248	21 de sus	Neneki	Nencki	"
252	11 de jos	cistidină	histidină	"
257	22, 23, 24 şi 25 de sus	componenţe	componente	"
258	1 de sus	componenţe	componente	"
298	5 şi 8 de sus	1 ml	1 mm^3	"
299	21 de jos	raticulare	reticulare	"
349	6 de sus	anamnetică	anamnestică	"
349	11 de jos	anamnetice	anamnestice	"
361	27 de sus	precipitogen	precipitinogen	"
393	23 de jos	Priquet,	Pirquet,	"
398	21 şi 22 de jos	Adelsberg	Adlersberg	"
401	19 de jos	umbeliform	umbreliform	"
403	9 de sus	Gildemeistel	Gildemeister	"
409	10 de jos	diseptol	diseptal	"
424	Tabelul 44	intraveninos	intravenos	"
424	Tabelul 44	*Chroobacterium iodinum*	*Chromobacterium iodinum*	"
439	12 de sus	ANDREWS H. C. —	ANDREWES H. C. —	"
440	9 de sus	BARSKIG.,	BARSKI G.,	"
441	5 de sus	formele Sale	formele S ale	Tipografiei
442	18 de sus	CHATLY N.	HEATLEY	Editurii
442	21 de sus	CHAMERLAND	CHAMBERLAND	"
443	1 şi 2 de jos	şi AMER J. — Cancer,	*American Jurnal Cancer*	"
444	24 de sus	HANDLEY PH.	HADLEY PH.	"
444	32 de sus	ALBOTIN G. I.	HALBOTIN G. I.	Tipografiei

Scanned with OKEN Scanner

Pag.:	Rînd:	În loc de:	Se va citi:	Din vina:
444	9 de jos	1848	1948	Editurii
445	9 de sus	microbacteriilor	mixobacteriilor	„
445	3 de jos	KORSELEVA L. S. —	GORSELEVA L. S. —	„
445	1 de jos	*nervsiota*	*nervnoi*	„
447	21 de jos	MANUDARING —	MANWARING —	„
448	12 de sus	bactericide,	bacteriene,	„
449	21 de jos	chimică	clinică	„
449	11 de jos	PEȘKOVA M. —	PEȘKOV M. —	„
450	4 de sus	chimice	clinice	„
450	11 de jos	mitilo-conges-	actino-conges-	„
451	1 de sus	JERSIN A. —	YERSIN A. —	Tipografiei
451	31 de sus	SEIMBOLD E. H.	SEIBOLD E. H.	Editurii
452	14 de jos	tuberculoasă	pasteurelică	„
453	22 de sus	TREFONEL	TRÉFOUEL	„
454	11 de jos	ZABLOKI B.	ZABLOCKI B.	„
454	10 de jos	*microbive*	*microbiol*	„

La bibliografie în loc de: *Analele Institutului de Patologie și Higienă Animală* se va citi *Anuarul Institutului de Patologie și Higienă Animală* iar în loc de *Jurnal microbiologhii, epidemiologhii i imunologhii* se va citi *Jurnal microbiologhii epidemiologhii i imunobiologhii.*

Stamatin N. „Microbiologia veterinară“ vol. I.

BIBLIOTECA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÂNE

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

T. 916

Redactor de carte : Kövari Ioan
Tehnoredactor : Andreica Virgil
Corector : Mohilo Maria

Dat în lucru 14.IV.956. Bun de tipar 6.VIII.956. Tiraj 2.060 ex. pînză mată. 1040 ex. pînză pergamoid. Hîrtie velină sat. de 80 g. m.p. Format 70×100/16. Coli editoriale 36,520. Coli tipar 28,750+6 planşe. Ediţia I. Comanda 172. A. 01089/956. Pentru bibliotecile mari indicele de clasificare 576.8. Pentru bibliotecile mici 57.

Tiparul executat sub com. nr. 489 la Combinatul Poligrafic **Casa Scînteii „I. V. STALIN", Bucureşti — R.P.R.**